



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
BRUNA MARIANA TARTARI DE OLIVEIRA

HIPERALGESIA MECÂNICA DURANTE O COMPORTAMENTO DE DOENÇA EM  
RATOS ADULTOS APÓS EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL NA  
ADOLESCÊNCIA.

CURITIBA

2017

BRUNA MARIANA TARTARI DE OLIVEIRA

HIPERALGESIA MECÂNICA DURANTE O COMPORTAMENTO DE DOENÇA EM  
RATOS ADULTOS A APÓS EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL NA  
ADOLESCÊNCIA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander R. Zampronio

Co-orientador: Dr. Diego Correia

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas  
(Gianna Mara Seriski Silva – CRB/9 1406)

Oliveira, Bruna Mariana Tartari de

Hiperalgesia mecânica durante o comportamento de doença em ratos adultos após exposição intermitente ao etanol na adolescência. / Bruna Mariana Tartari de Oliveira. Curitiba, 2017.  
69 p.: Il. ; 30 cm.

Orientador: Aleksander R. Zampronio

Coorientador: Diego Cordeiro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Hiperalgesia 2. Álcool 3. Adolescência I. Título II. Zampronio, Aleksander Roberto III. Cordeiro, Diego IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20 -41) 615.7828




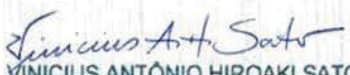
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e nove de Março de dois mil e dezessete às 14:30 horas, na sala 107 - Anfiteatro, Anexo I do Setor de Ciências Biológicas - Farmacologia, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **BRUNA MARIANA TARTARI DE OLIVEIRA** para a Defesa Pública de sua dissertação intitulada **HIPERALGESIA MECÂNICA NO COMPORTAMENTO DE DOENÇA EM RATOS APÓS EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: **ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO (UFPR)**, **VINICIUS ANTÔNIO HIROAKI SATO (UFPR)**, **RENATA CRISTIANE DOS REIS (HC)**. Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 29 de Março de 2017.

  
**ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO**  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
**VINICIUS ANTÔNIO HIROAKI SATO**  
Avaliador Externo (UFPR)

  
**RENATA CRISTIANE DOS REIS**  
Avaliador Externo (HC)





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BRUNA MARIANA TARTARI DE OLIVEIRA** intitulada: **HIPERALGESIA MECÂNICA NO COMPORTAMENTO DE DOENÇA EM RATOS APÓS EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 29 de Março de 2017.

  
ALEKSANDER ROBERTO ZAMPONIO  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
VINICIUS ANTÔNIO HIROAKI SATO  
Avaliador Externo (UFPR)

  
RENATA CRISTIANE DOS REIS  
Avaliador Externo (HC)

## **Agradecimentos**

À minha família, Ana, Mário, Ana Luísa e Laíssa, por me permitirem a vida e serem os meus eternos mestres do bem e do amor.

Ao Professor Aleksander Roberto Zampronio por ter me aceito como sua orientada, me guiando em todos os passos deste trabalho. Sou grata por ser meu mestre, pelo exemplo e amizade que me permitiram crescer intelectual e moralmente.

Ao Diego Correia pela contribuição como amigo e co-orientador.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação, Dor e Febre com quem construí amizade nesses anos. Levo para a vida todas os momentos, todo o apoio para o meu desenvolvimento. Luís, Débora, Felipe, Mariane, Tatiane, Isabella, Gustavo, Fernanda e Dunia, sou grata ter vocês.

Aos amigos de vida e representação discente Adriano, Luiz e Débora por compartilharem este e tantos outros momentos.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia que contribuíram para a minha formação.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia pelo cuidado com as questões administrativas que permitiram a minha admissão no Programa até a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários terceirizados pela cordialidade e por cuidarem de todos os detalhes que permitiram o ambiente estar em condições para que este trabalho fosse realizado.

Aos amigos alunos do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, pela amizade e momentos divididos.

A CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

*SOU GRATA.*

“O que mais me surpreendeu foi o fato de tudo ter dado certo. Encontrei exatamente o que estava procurando. Na verdade, encontrei mais do que ousava esperar. Entretanto, agora, olhando para trás, acho que esse resultado espantoso era quase inevitável. Aprendi a acreditar que existe no universo algo que eu chamo de ‘A Física da Procura’ – uma força natural governada por leis tão reais quanto a lei da gravidade ou do momentum. A regra da Física da Procura deve ser alguma coisa como **se você for corajoso o suficiente para deixar para trás tudo que lhe é familiar e reconfortante (que pode ser qualquer coisa – da sua casa a seu velho e amargo ressentimento) e partir em uma viagem em busca da verdade, interna ou externamente, e se você está sinceramente disposto a ver tudo que lhe acontecer durante essa viagem como um ensinamento, e se aceitar cada um que encontrar durante a viagem como um mestre, e se você estiver, acima de tudo, preparado para encarar e perdoar algumas realidades desagradáveis a seu respeito, a verdade não lhe será ocultada.**’ É essa a minha crença. Não posso deixar de acreditar nisso, baseada em minha experiência.”

Elizabeth Gilbert

## RESUMO

A exposição aguda e crônica ao etanol pode aumentar o risco de infecções ao alterar os mecanismos de defesa inata do hospedeiro. A adolescência é um período crítico para o desenvolvimento cerebral e os insultos durante este período podem ter consequências a longo prazo. O presente estudo investigou os efeitos da exposição do tipo *binge* ao etanol em ratos adolescentes sobre a hiperalgesia mecânica observada durante a síndrome de doença induzida pela injeção sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS) ou injeção intracerebroventricular (icv) de interleucina-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) após a cessar a exposição. Ratos Wistar machos foram expostos a etanol a partir do dia pós-natal (PND) 25 até o PND 38 em um padrão tipo *binge*. A hiperalgesia foi avaliada na pata traseira direita após a injeção de LPS (5 e 50  $\mu\text{g/kg}$ , intraperitonealmente) no PND 51 e PND 63, ou por i.c.v. ou intraplantar (i.pl.) de IL- $\beta$  (3 ng ou 1 ng, respectivamente) no PND 51. A exposição ao etanol durante a adolescência não alterou o limiar mecânico dos animais que aumentou ao longo da idade. A administração sistêmica de LPS (0,5-50  $\mu\text{g/kg}$ ) em ratos adultos induziu uma hiperalgesia mecânica dose-dependente. A exposição tipo *binge* ao etanol induziu um aumento significativo na hiperalgesia mecânica induzida por LPS 50  $\mu\text{g/kg}$  no PND 51 e PND 63 que durou até 24 h após a injeção. Esta alteração não foi observada com doses mais baixas de LPS (5  $\mu\text{g/kg}$ ). O tratamento oral agudo com etanol 24 h antes da administração do LPS não alterou a hiperalgesia mecânica. A injeção i.c.v. de IL-1 $\beta$  (1-10 ng) também induziu hiperalgesia mecânica dose-dependente na pata traseira direita em animais não expostos. Em animais expostos, a injeção de IL-1 $\beta$  i.c.v ou i.pl. também aumentou a resposta hiperalgésica no PND 51. Estes resultados sugerem que a exposição ao etanol durante a adolescência provoca alterações no sistema nervoso central que podem aumentar a hiperalgesia mecânica observada durante a síndrome de doença e pode ser observada até a idade adulta, após cessar a exposição ao etanol.



## ABSTRACT

Acute and chronic ethanol exposure may increase the risk of infections by altering innate host's defense mechanisms. Adolescence is a critical period for brain development and insults during this period may have long-lasting consequences. The present study investigated the effects of binge-like ethanol exposure in adolescent rats on mechanical hyperalgesia observed during the sickness syndrome that was induced by the systemic injection of lipopolysaccharide (LPS) or the intracerebroventricular (i.c.v.) injection of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) after the cessation of the exposure. Male Wistar rats were exposed to ethanol from postnatal day (PND) 25 to PND 38 in a binge-like pattern. Hyperalgesia was assessed on the right hind paw after the injection of LPS (5 and 50  $\mu$ g/kg, intraperitoneally) on PND 51 and PND 63, or by i.c.v. or intraplantar (i.pl.) injection of IL-1 $\beta$  (3 ng or 1 ng, respectively) on PND 51. Ethanol exposure during adolescence did not alter mechanical threshold of the animals which increased alongside the age. Systemic administration of LPS (0.5-50  $\mu$ g/kg) in adult rats induced a dose-related mechanical hyperalgesia. Binge-like ethanol exposure induced a significant increase in mechanical hyperalgesia induced by LPS 50  $\mu$ g/kg on PND 51 and PND 63 that lasted till 24 h after the injection. This change was not observed at lower LPS doses (5  $\mu$ g/kg). Acute oral treatment with ethanol 24 h prior to LPS administration did not alter the mechanical hyperalgesia. Intracerebroventricular injection of IL-1 $\beta$  (1-10 ng) also induced a dose-related mechanical hyperalgesia in the right hind paw in non-exposed animals. In binge-like exposed animals, i.c.v. or i.pl. injection of IL-1 $\beta$  also increased the hyperalgesic response on PND 51. These results suggest that binge-like ethanol exposure during adolescence causes changes in the central nervous system that can increase the mechanical hyperalgesia observed during sickness syndrome and can be observed until adulthood, after the cessation of ethanol exposure.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estímulos, receptores e vias de condução da dor. ....	17
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da exposição tipo <i>binge</i> ao EtOH.....	31
<b>Figura 3.</b> Influência do consumo de EtOH no modelo de <i>binge</i> sobre o limiar mecânico em ratos em diferentes idades.....	34
<b>Figura 4.</b> Hiperalgesia mecânica induzida por injeção sistêmica de LPS em ratos.....	36
<b>Figura 5.</b> Hiperalgesia mecânica induzida pela administração intraperitoneal de LPS em animais que receberam EtOH no modelo <i>binge</i> .....	38
<b>Figura 6.</b> Hiperalgesia mecânica induzida pela administração intraperitoneal de LPS em animais que receberam EtOH no modelo <i>binge</i> .....	39
<b>Figura 7.</b> Área sob a curva (unidades arbitrárias, U. A.) observadas nas figuras 5B e 6B dos animais que receberam LPS 50 µg/kg.....	40
<b>Figura 8.</b> Hiperalgesia mecânica induzida por administração intraperitoneal de LPS em animais submetidos a exposição aguda ao EtOH.....	42

<b>Figura 9.</b> Área sob a curva (unidades arbitrárias, U.A.) observadas na Figura 7 .....	43
<b>Figura 10.</b> Hiperalgesia mecânica induzida por injeção intracerebroventricular de IL-1 $\beta$ em ratos não expostos ao EtOH.....	45
<b>Figura 11.</b> Hiperalgesia mecânica induzida por injeção intracerebroventricular de IL-1 $\beta$ em animais que receberam EtOH no modelo <i>binge</i> .....	46
<b>Figura 12.</b> Área sob a curva (unidades arbitrárias, U.A.) observadas na Figura 10 .....	46
<b>Figura 13.</b> Hiperalgesia mecânica induzida pela administração intraplantar (i.p.l.) de IL-1 $\beta$ em animais que receberam <i>binge</i> EtOH.....	48
<b>Figura 14.</b> Área sob a curva (unidades arbitrárias, U.A.) observadas na Figura 13 .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASIC – Canal iônico sensível ao ácido

AUC – Área sob a curva

DRASIC – Canal iônico ASIC específico do gânglio da raiz dorsal

EtOH – Etanol

GRD – Gânglio da raiz dorsal

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IASP – “International Association for the Study of Pain” – Associação

Internacional de estudo da dor

i.c.v - Intracerebroventricular

i.p. - Intraperitoneal

i.p.l - Intraplantar

IL - Interleucina

IL-1R1 – Receptor de interleucina 1

LENAD – Levantamento Nacional de Álcool e Drogas

LPS – Lipopolissacarídeo

OMS – Organização Mundial de Saúde

MDEG – Canal iônico tipo degerina

MHC I – Complexo de principal de Histocompatibilidade I

MOR – Receptor opioide  $\mu$

NIAA – “National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism” - Instituto

Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo

NMDA - N-metil D-Aspartato

NR2B – Receptor N-metil D-aspartato 2B



PND – Dia pós-natal

Sal - Salina

TRL4 – Receptor tipo *Toll* 4

TNF – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TREK-1 – Canal de potássio 1

TRPM8 – Receptor de potencial transitório melastina 8

TRPV - Receptor de potencial transitório vanilóide

U.A.- Unidades Arbitrárias

OMS – Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1 ETANOL COMO DROGA DE ABUSO .....	12
1.2 ADOLESCENCIA COMO PERÍODO CRÍTICO DO DESENVOLVIMENTO .....	13
1.3 O CONSUMO DO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA.....	14
1.4 DOR E HIPERALGESIA.....	15
1.5 O COMPORTAMENTO DE DOENÇA ( <i>SICKNESS BEHAVIOR</i> ).....	21
1.6 A DOR E O USO DE ETANOL.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 ANIMAIS.....	27
3.2 HIPERALGESIA MECÂNICA.....	28
3.3 IMPLANTE DA CÂNULA INTRACEREBRAL E MICROINJEÇÃO.....	28
3.4 CURVA DOSE-RESPOSTA DA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR LPS E IL-1 $\beta$ .....	29
3.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO EtOH DURANTE A ADOLESCENCIA .....	30
3.6 ANÁLISE DE DADOS.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 LIMAR MECÂNICO EM DIFERENTES IDADES.....	33
4.2 HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR LPS.....	35
4.3 HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR IL-1 $\beta$ .....	43
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO.....	56
7 REFERENCIAS.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ETANOL COMO DROGA DE ABUSO

O etanol (EtOH) é a substância psicoativa de maior uso no Brasil. Vários fatores influenciam este consumo, principalmente o fato de ser uma droga lícita, socialmente aceita e muitas vezes ter seu uso incentivado pela sociedade no que se pode chamar de “ritos de passagem” como por exemplo a primeira intoxicação do adolescente, além do fácil acesso, baixo preço e deficiências na fiscalização (venda para menores de idade, por exemplo), entre outros.

No entanto, a ingestão de EtOH pode causar danos fisiológicos temporários ou permanentes e o seu padrão de ingestão determina a intensidade dos efeitos observados. Por exemplo, a ingestão aguda de EtOH diminui a resistência a infecções e aumenta o risco de mortalidade em seres humanos e animais com sepse (PRUETT et al., 2010). Outras complicações clínicas podem ocorrer referentes ao seu uso, como efeitos deletérios sobre o trato gastrointestinal, sistema nervoso, sistema cardiovascular, sistema hematológico, sistema reprodutor e função sexual, bem como desordens psiquiátricas (quadros psicóticos, depressão, síndrome de abstinência, síndromes demenciais, distúrbios de ansiedade, entre outras) (Silveira e Moreira, 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo abusivo de EtOH é responsável por mais de 2,5 milhões de mortes prematuras por ano e quase 4 % de todas as mortes do mundo são atribuídas ao álcool.

Projeções recentes indicaram que o consumo de EtOH continuará a crescer nas próximas décadas, e que os adultos e jovens serão responsáveis pela maior taxa de aumento de consumo (OMS, 2014). Dados levantados pelo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD, 2013) indicaram que o consumo de EtOH no Brasil está aumentando, principalmente entre os adolescentes, tornando-se um grave problema de saúde.

## 1.2. A ADOLESCÊNCIA COMO PERÍODO CRÍTICO DO DESENVOLVIMENTO

A adolescência é um período de desenvolvimento crítico pois é quando certas áreas cerebrais sofrem mudanças estruturais e funcionais (Fine e Sung, 2014). Embora adaptações cerebrais estejam presentes durante toda a vida, grande parte do potencial e vulnerabilidades do cérebro podem, em parte, depender das duas primeiras décadas de vida (TOGA, et al. 2006).

Alterações decorrentes do próprio desenvolvimento no cérebro adolescente incluem o aumento da neurogênese hipocampal, reforço sináptico no córtex frontal, aumento da mielinização, maturação de reguladores como receptores e transportadores, bem como a maturação hormonal. Esses processos são conduzidos por uma programação inata capaz de responder a estímulos ambientais (CREWS, 2016).

Outras mudanças estruturais e funcionais na plasticidade sináptica e na conectividade neural ocorrem durante a adolescência e envolvem os processos de mielinização dos axônios e produção dos mesmos, bem como a eliminação de sinapses, ou poda. Ambos processos são importantes para uma comunicação



eficiente entre regiões cerebrais, funcionamento cognitivo e comportamento (PASCUAL, 2011).

Em ratos este período de grandes mudanças é considerado, como o intervalo de tempo entre os dias pós-natal (PND) 25 e 42 para adolescência, e para adolescência tardia ou adulto jovem entre PND 43 a 55. Estas faixas etárias correspondem a aproximadamente 10 a 18 e 18 a 25 anos de idade em seres humanos, respectivamente (SPEAR, 2015).

O consumo excessivo de EtOH durante este período de vida pode ter consequências importantes sobre o sistema nervoso central e o sistema imunológico, que serão aqui discutidas a seguir (PASCUAL et al., 2014, FOWLER et al., 2014, GORAL et al., 2008).

### 1.3. O CONSUMO DE ETANOL NA ADOLESCÊNCIA

O consumo de EtOH geralmente se inicia já nos primeiros anos da adolescência, entre 12 e 14 anos de idade, embora alguns indivíduos iniciem o consumo anteriormente, na infância. Este consumo aumenta gradualmente entre 12 e 21 anos, frequentemente para um padrão de consumo excessivo de EtOH (MASTEN et al., 2009). Deste modo, também há uma alta prevalência de consumo de etanol entre os estudantes universitários (COURTNEY e POLICH, 2010). De acordo com o *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAA), o consumo excessivo de bebidas alcoólicas em episódios (*binge*) é um padrão de consumo que resulta em níveis de álcool no sangue de 0,08 g/dl. Isso

geralmente ocorre após quatro doses de bebida destilada em mulheres e cinco doses de bebida destilada em homens durante um período de 2h.

O hábito de beber é menos frequente em adolescentes do que em adultos, porém a quantidade consumida é consideravelmente maior, com níveis médios de consumo de etanol que podem caracterizar o *binge* (WINDLE, 2016). Refletindo esse padrão de alta ingestão, o consumo mundial de álcool em 2010 foi de 6,2 L de álcool puro por pessoa com idade igual ou superior a 15 anos, o que se traduz em 13,5 g de álcool puro por dia (WHO, 2014).

No presente estudo procuramos avaliar quais as consequências do consumo de EtOH durante a adolescência no padrão *binge* sobre a hiperalgesia induzida por doença, portanto, nos tópicos seguintes passaremos a descrever o processo doloroso a fim de fornecer ferramentas para o entendimento de como o EtOH poderia afetar este processo e suas consequências.

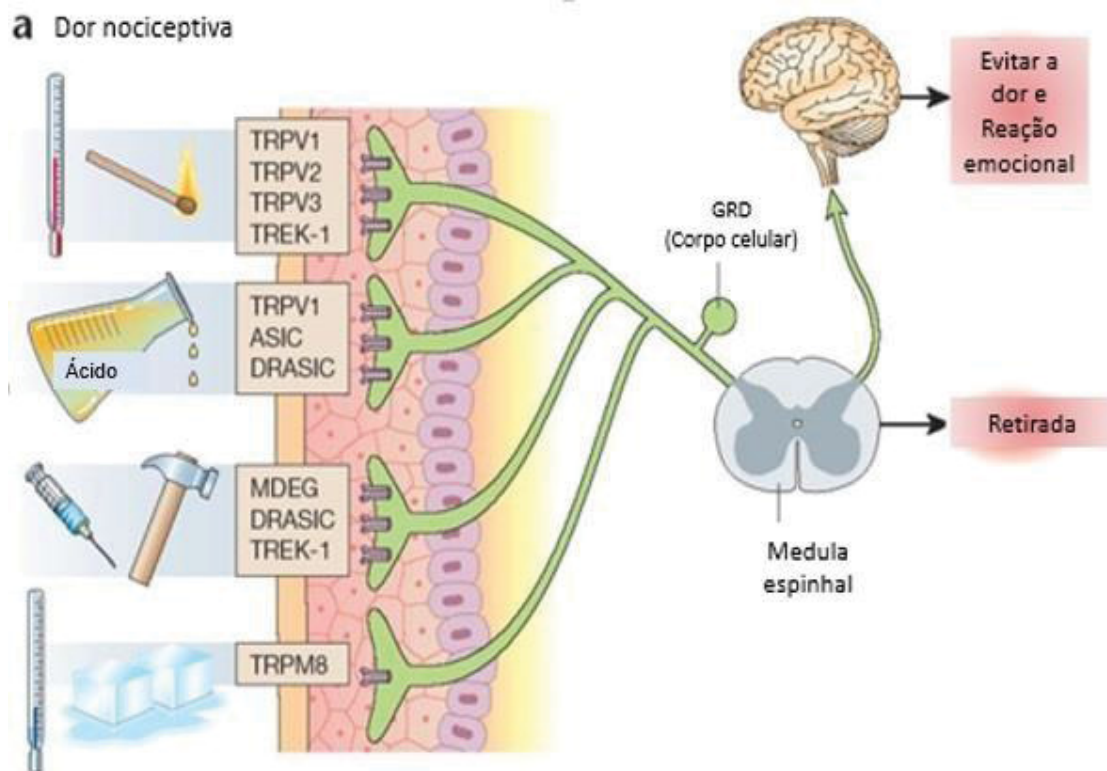
#### 1.4. DOR E HIPERALGESIA

Estímulos físicos, químicos ou biológicos de certa intensidade e potencialmente nocivos podem causar a sensação de dor e eventualmente provocar lesão tecidual. No entanto, existem mecanismos a serem ativados para que o estímulo nocivo seja detectado por terminações nervosas sensoriais, seja codificado como uma mensagem nociceptiva e então conduzido e processado no sistema nervoso central (MILLAN, 1999). De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP) a dor é “uma experiência sensorial e

emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano” (LOESER & TREEDE, 2008).

A dor, denominada como dor nociceptiva, pode ocorrer através da ativação de fibras nociceptivas do tipo C ou A $\delta$ . As fibras A $\delta$  são finamente mielinizadas, com diâmetro e velocidade de condução médios enquanto que as fibras C são amielinizadas, de pequeno diâmetro e com baixa velocidade de condução (JULIUS, 2001). Os receptores presentes nestas fibras nociceptivas são especializados de tal forma que se tornam sensíveis aos estímulos térmicos, mecânicos e alguns estímulos químicos e sua ativação promove a tradução e codificação dos estímulos nocivos externos em atividade elétrica (Fig. 1) (JULIUS, 2001, SCHOLZ, 2002). A atividade elétrica é amplificada pela abertura dos canais de sódio gerando um potencial de ação, promovendo então a condução da mensagem nociceptiva da fibra aferente primária e seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e trigeminal para as terminações dos neurônios sensoriais de segunda ordem. As fibras nociceptivas aferentes primárias, localizadas na periferia, inervam as lâminas superiores I e II do corno da raiz dorsal da medula espinhal, liberam neurotransmissores neuropeptídicos como substância P (HUNT, 1985) e aminoácidos excitatórios como o glutamato e o aspartato (AANONSEN, 2001). Nos estados de dor, as células da glia encontram-se quiescentes (WATKINS, 2001). No entanto, estas células presentes na medula podem ser ativadas após estímulo inflamatório (FU, et al. 1999). De forma ascendente, o neurônio de segunda ordem é ativado no corno da raiz dorsal, conduz a mensagem nociceptiva para o sistema nervoso central, especificamente para o tálamo e tronco cerebral, e de lá para o córtex

somatosensorial onde os aspectos sensoriais e discriminativos da dor são processados (KUNER, 2010).



**Figura 1.** Estímulos, receptores e vias de condução da dor. Um estímulo nocivo é detectado e altera a atividade elétrica nos terminais periféricos das fibras C amielinizadas e A $\delta$  finamente mielinizadas, através de receptores específicos ou canais iônicos sensíveis ao calor, estímulo mecânico, prótons e frio. Esta atividade é conduzida à medula espinhal e posteriormente ao córtex, onde a sensação de dor é percebida. Na figura, GRD indica o gânglio da raiz dorsal, TRPV1 o receptor vanilóide de potencial transitório 1, TRPV2 o receptor vanilóide de potencial transitório 2, TRPV3 o receptor vanilóide de potencial transitório 3, TREK-1 canal de potássio 1, ASIC canais iônicos sensíveis a ácido, DRASIC ASIC específico do gânglio da raiz dorsal, MDEG canal iônico do tipo degerina, e TRPM8 é o receptor vanilóide de potencial transitório tipo melastina 8 (Adaptado: SCHOLZ, J. and C.J. WOOLF, 2002).



A dor tem utilidade adaptativa e de sobrevivência sob circunstâncias normais, protegendo o indivíduo de perigos do meio e conduzindo-o a ter comportamentos de recuperação como a esquivar ou fuga de danos (CAMPBELL e MEYER, 2006). Em alguns casos, como em um período de infecção ou doença, o aumento da dor pode ser benéfico para o organismo por diminuir o seu período ativo, garantindo reserva energética para o combate da doença e permitindo a recuperação (WATKINS et al., 1994).

Em condições fisiológicas, para que um estímulo seja capaz de evocar a sensação de dor o mesmo deve ser intenso, potencialmente causador de danos, e que é capaz de ativar nociceptores e neurônios centrais associados. No entanto, em condições patológicas, a dor pode ser desencadeada por um estímulo que normalmente seria percebido como inócuo, ou de baixa intensidade dolorosa. Este estado de alteração sensorial onde há um aumento da sensibilidade à dor é chamado de hiperalgesia, caracterizada pelo limiar de ativação reduzido ou dor aumentada para estímulos normalmente dolorosos (SIMONE, 1992). Em outros casos, este aumento de sensibilidade pode promover dor evocada por um estímulo inócuo, caracterizando a alodinia (SIMONE, 1992).

A dor inflamatória deve-se principalmente aos efeitos locais de mediadores inflamatórios que podem, portanto, sensibilizar ou ativar os terminais de neurônios nociceptivos, causando dor local. Há um conjunto substancial de evidências que demonstram que a síntese de prostaglandinas e de aminas simpatomiméticas ocorre subsequentemente à liberação de uma cascata de citocinas e outros mediadores (WATKINS et al., 2001, FU et al., 1999, KUNER, 2010, FERREIRA et al., 1988, FERREIRA et al., 1993, CUNHA et al., 1991;

CUNHA et al., 1992, SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995, WOLFF et al., 1997, WOLFF et al., 1997, POOLE et al., 1999).

Para reproduzir este estado em modelos experimentais, diferentes estímulos imunológicos podem ser utilizados, como a carragenina, ou o lipopolissacarídeo (LPS), que em modelo de hiperalgesia mecânica, induzem a formação de mediadores inflamatórios como a bradicinina que foi capaz de estimular a formação de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (FERREIRA et al., 1993, POOLE et al., 1999). A liberação de TNF- $\alpha$ , por sua vez, é capaz de estimular a síntese de outras citocinas como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6), as quais induziram a expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) e consequente formação de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), e de interleucina-8 (IL-8), o que estimulou a liberação de aminas simpaticomiméticas como a dopamina e a noradrenalina (CUNHA et al., 1992). Estes mediadores por fim promovem o aumento dos níveis intracelulares de fosfato cíclico de adenosina (AMPc) que resulta na redução do limiar de excitação destas fibras ou sensibilização.

A ativação da via de sinalização celular por AMPc desempenha um papel fundamental na sensibilização neuronal, e camundongos deficientes em adenilato ciclase estão protegidos contra a dor inflamatória (WEI et al., 2002). A contribuição da proteína quinase A (PKA) ativada por AMPc para a dor inflamatória tem sido também extensivamente estudada (TAIWO e LEVINE 1991; ALEY e LEVINE 1999). Já a proteína trocadora diretamente ativada por AMPc (Epac1) é uma descoberta mais recente que participa da sinalização por AMPc. A primeira evidência de sua participação veio do estudo de Hucho e colaboradores (2005) as quais reportaram que a injeção intraplantar de um

agonista de Epac1 leva a uma hiperalgesia de longa duração induzida por epinefrina (HUCHO et al., 2005). Evidências mais recentes demonstram que camundongos nocaute para Epac1 não desenvolvem hiperalgesia mecânica durante a neuropatia periférica e que esta proteína está envolvida na ativação de mecanorreceptores Piezo 2 (EIJKELKAMP et al., 2013). No entanto não é sabido se Epac 1 também é requerida para dor inflamatória.

Portanto, o sistema imunológico ativado afeta o sistema de dor, acarretando em uma maior sensibilidade à dor, uma vez que componentes inflamatórios possuem ações centrais e periféricas sobre os neurônios nociceptivos (WATKINS & MAIER, 2000). Interações entre o sistema nervoso e o imunológico são esperadas sempre que substâncias derivadas de células imunológicas entram em contato com neurônios (WATKINS, et al., 2007).

Quando bactérias ou alguns destes mediadores atingem a circulação sanguínea, os indivíduos experimentam uma hiperalgesia generalizada (WATKINS & MAIER, 2000). E embora esses mecanismos sejam menos conhecidos, sua função como mecanismo protetor, como descrito anteriormente, é reconhecida. A injeção intraperitoneal, portanto sistêmica e não local, de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas ou de citocinas como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  também aumentam a sensibilidade nociceptiva em roedores sugerindo que um processo hiperalgésico sistêmico está ocorrendo (MAIER, et al. 1993, WATKINS, et al., 1995). Esta hiperalgesia está incluída entre os sinais do comportamento de doença (*sickness behavior*) que passaremos a discutir adiante.

### 1.5. O COMPORTAMENTO DE DOENÇA (*SICKNESS BEHAVIOR*)

Muitas pessoas experimentam episódios de doença infecciosa aguda e a despeito dos diversos microorganismos que causam estas doenças e os diferentes locais de infecção, os sintomas que ocorrem são similares e incluem febre, corpo dolorido (hiperalgesia induzida por doença), perda de apetite e sonolência. Este conjunto de sintomas é conhecido como síndrome de doença (*sickness syndrome*) ou comportamento de doença (*sickness behavior*) e é uma resposta adaptativa do sistema nervoso central que tem a função de combater a infecção através de alterações comportamentais, autônomicas e endócrinas (SAPER et al., 2012).

Muitos dos patógenos capazes que induzir o estado de doença não atingem diretamente o cérebro em decorrência da barreira hematoencefálica. Assim, células do sistema imunológico como os monócitos, macrófagos e micróglia convertem a mensagem para o cérebro, ao reconhecer padrões moleculares associados a patógenos como por exemplo o LPS, através de receptores associados a padrão como os receptores do tipo *Toll* (TLR) (JOHNSON, 2002). A administração intraperitoneal de LPS provoca uma resposta de inflamação sistêmica, iniciada pela produção local de mediadores inflamatórios como a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-6 (Dantzer et al., 2008). Estes mediadores podem agir sobre o sistema nervoso central, ao atravessar a barreira hematoencefálica, e assim alterar o comportamento (WATKINS et al., 1994).

Estas citocinas coordenam a resposta inflamatória local contra patógenos ou lesão tecidual e quando produzidas em quantidade suficiente também atuam de maneira sistêmica produzindo o quadro de *sickness syndrome* (SAPER et al.,



2012). Este estado é responsável por reorganizar as percepções e ações de indivíduos doentes para reagir melhor a uma infecção (DANTZER, 2001).

Sabe-se que o consumo de álcool altera esta resposta além de desenvolver doenças multissistêmicas em órgãos periféricos como as lesões no rim, fígado e coração, bem como transtornos psiquiátricos e neurológicos (NELSON e KOLLS, 2002), sendo considerado um dos principais riscos à saúde mundial.

As respostas imunológicas adaptativas envolvem a proliferação de células T antígeno-específicas, a ativação de células B de memória imunológica, e a produção de anticorpos para a defesa do hospedeiro e eliminação de patógenos e proteção contra futuras infecções. No entanto, este processo de imunidade pode ser alterado pelos efeitos moduladores do álcool sobre os diferentes componentes celulares no sistema imunológico inato ou adaptativo (BROWN et al., 2006, COOK, 1998, SZABO, 1999).

A exposição aguda ao EtOH em seres humanos (homens e mulheres) suprime a liberação de citocinas pró-inflamatórias em resposta a um desafio inflamatório, bem como o recrutamento de neutrófilos e a função fagocítica, e prejudica a quimiotaxia, no período de 2h a 5h após a ingestão (AFSHAR et al., 2015). No entanto, CREWS et al. (2015) descobriram que a sinalização neuroimune no cérebro é ativada em modelos de consumo excessivo de álcool em humanos, com aumento do marcador microglial Iba-1 postmortem no cérebro de indivíduos com alcoolismo. Além disso, a exposição intermitente ao EtOH durante a adolescência induziu lesão cerebral no hipocampo, neocórtex e cerebelo de ratos 24 h após a última administração (PASCUAL et al., 2007). Essas mudanças foram provavelmente responsáveis pelos déficits

comportamentais observados até 3 semanas após a cessação da exposição ao EtOH (PASCUAL et al., 2007). Essas alterações no sistema nervoso central também sugerem que o consumo de EtOH poderia influenciar o processamento do comportamento de dor.

Assim, fatores que comprometem a imunidade inata e adaptativa alterando sua resposta provocam impactos sobre o estado de saúde, gerando maior risco de se adquirir doenças infecciosas (COOK, 1998; HAPPEL e NELSON, 2005; MACGREGOR e LOURIA, 1997; MESSINGHAM, et al., 2002; NELSON e KOLLS, 2002; SZABO, 1999).

Watkins e colaboradores (1994) demonstraram que agentes indutores de doença (LPS e LiCl), podem também promover uma resposta de hiperalgesia por ativar vias ascendentes da dor indiretamente. Dentre estes agentes, o LPS vem sendo extensivamente estudado por seus efeitos indutores de hiperalgesia mecânica e térmica em ratos, por administração central ou periférica (KEHL et al., 2004).

Neste estudo, o LPS foi utilizado neste estudo como agente indutor da hiperalgesia mecânica após a exposição ao etanol.

## 1.6. A DOR E O USO DE ETANOL

Dentre os fatores indicados como capazes de alterar o sistema nervoso e o sistema imunológico, está o abuso crônico de EtOH que causa um aumento nos níveis de citocinas como a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  sistêmico, assim como no sistema nervoso central (CREWS et al., 2006 e NIXON, 2009).

Estudos pré-clínicos e em ratos demonstram que existe um efeito neurotóxico do EtOH sobre a medula espinhal (NARITA et al., 2007), bem como sobre nervos periféricos, e que a exposição prologada e excessiva ao EtOH por si gera neuropatia periférica associada a pequenas fibras, em roedores e em humanos (MELLION et al., 2011). Outro estudo também mostra que o consumo crônico excessivo de EtOH pode também levar ao desenvolvimento de um quadro de dor espontânea periférica acompanhado de ardência, hiperalgesia e alodinia, denominado neuropatia alcoólica (ORTIZ-PLATA et al., 1998).

O uso de EtOH é também um fator de risco para o desenvolvimento de neuropatia periférica e de co-morbididades em pacientes sendo tratados para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MOYLE e SADLER, 1998, NATH et al., 2002, LOPEZ et al., 2004, FERRARI e LEVINE, 2010).

Apesar do uso habitual de EtOH por pacientes com dor crônica, estudos recentes mostraram que o consumo intermitente de EtOH não aliviou a hiperalgesia térmica associada a dor neuropática (GONZALEZ-SEPULVEDA et al., 2016). Sabe-se que a administração crônica de EtOH induz tolerância aos seus efeitos antinociceptivos, que é seguida de um estado hiperalgésico nas patas dos animais observada 12 h após a última administração de EtOH (GATCH, 2002). Outros estudos também observaram que o consumo de bebidas alcoólicas induz hiperalgesia mecânica, térmica e inflamatória durante o seu período de privação (BERGESON et al., 2016, DINA et al., 2006).

Os estudos acima estão entre os poucos estudos que exploraram a dor e o uso concomitante de EtOH. No entanto, os efeitos do uso de EtOH são claramente dependentes da frequência de ingestão (uso agudo ou crônico) bem

como da resposta avaliada (hiperalgesia térmica, mecânica, neuropatia, etc.). Entretanto, existem muito menos estudos que avaliaram o efeito do consumo de EtOH na adolescência

Nosso grupo demonstrou recentemente que a exposição do tipo *binge* ao EtOH durante a adolescência reduziu a resposta febril induzida por LPS e IL-1 $\beta$  observada mesmo após 12 dias após cessar a exposição ao EtOH (TELLES et al., 2017). A administração de LPS nas doses utilizadas nesse estudo, certamente promove um comportamento de doença.

## 2. OBJETIVOS

Considerando os pontos discutidos acima, o presente estudo objetivou avaliar se a administração intermitente de EtOH durante a adolescência em ratos também pode alterar a resposta de hiperalgesia durante a o comportamento de doença induzido por LPS e IL-1 $\beta$ .

### 2.1. Objetivos específicos

1. Avaliar as variações do limiar mecânico em animais de diferentes idades após a exposição ou não ao EtOH na adolescência.
2. Avaliar a hiperalgesia mecânica induzida pela administração sistêmica de diferentes doses de LPS em animais expostos intermitentemente ao EtOH na adolescência, do PND 25 a 38.
3. Avaliar a hiperalgesia mecânica induzida pela administração sistêmica de LPS nos PND 51 e/ou PND63, em animais expostos agudamente ao EtOH.
4. Avaliar a hiperalgesia mecânica induzida no PND 51 pela administração i.c.v. de IL-1 $\beta$  em animais expostos intermitentemente ao EtOH na adolescência.

5. Avaliar a hiperalgesia mecânica induzida PND51, pela administração intraplantar de IL-1 $\beta$  em animais expostos intermitentemente ao EtOH na adolescência.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos em ratos Wistar machos, de 21 dias de idade, ou adultos (180g) obtidos do Biotério central da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram alojados em cinco indivíduos por caixa apropriada numa sala com temperatura controlada a 22 ° C  $\pm$  1 ° C durante um ciclo claro / escuro de 12 h / 12 h (acende-se às 7:00) com água e alimentos disponíveis *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso Animais da instituição sob o protocolo de número 813, e estavam em conformidade com as Diretrizes Brasileiras para experimentação animal do Conselho de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os procedimentos foram adotados para minimizar o número de animais utilizados e o seu sofrimento.

### 3.2. AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA

A hiperalgesia mecânica foi avaliada com o uso do analgesímetro eletrônico Von Frey (INSIGHT, RIBEIRÃO PRETO, SP), conforme descrito anteriormente por (REDIVO et al., 2016). Os animais foram colocados em compartimentos Plexiglass (comprimento 20 cm, largura 25 cm, altura 15 cm) sobre uma plataforma de malha de arame (espessura de 5 mm<sup>2</sup>), individualmente, durante 60 min antes do experimento para serem habituados. O piso de malha permitiu que a ponta do analgesímetro estimulasse superfície plantar média da pata traseira direita do animal com uma ponta de polipropileno (0,5 mm de diâmetro) fixada em um transdutor de força ligado a um leitor digital que permitiu verificar a massa aplicada. Uma força de aumento linear foi aplicada à pata até que houvesse uma resposta de retirada, registrando assim a massa aplicada em gramas. O limiar mecânico ou, a mínima intensidade de um estímulo para ser percebido como doloroso, foi calculado pelo valor médio de três respostas de retirada semelhantes. A presença de hiperalgesia mecânica foi caracterizada pela diferença entre o limiar mecânico médio observado antes e em momentos diferentes após a administração da administração de LPS ou IL-1 $\beta$ .

### 3.3. IMPLANTE DA CÂNULA INTRACEREBRAL E MICROINJEÇÃO

Para a administração intracerebroventricular (i.c.v.), uma cânula guia de aço inoxidável de diâmetro de 0,8 mm e 12 mm de comprimento foi implantada por cirurgia estereotáxica no ventrículo lateral direito sob anestesia com



cetamina / xilasina (90/10 mg/kg). As coordenadas estereotáticas foram as seguintes: 0,8 mm lateral à linha média, 1,5 mm posterior ao bregma e 2,5 mm abaixo da superfície do cérebro, com a barra incisiva na posição de 3,3 mm abaixo do zero horizontal (PAXINOS & WATSON, 1998). As cânulas foram fixadas ao crânio com pequenos parafusos e incorporados ao cimento acrílico dental, formando um capacete sobre o crânio dos animais. Após o procedimento, os animais foram tratados com antibiótico Terramicina (400 mg/kg, por via intramuscular).

Os animais passaram por um período de recuperação de pelo menos 5 dias antes da injeção de IL-1 $\beta$ . A IL-1  $\beta$  foi administrada através de um tubo de polipropileno P10, durante 1 min, no volume de 2  $\mu$ l. Terminado o experimento, cada rato foi anestesiado conforme descrito acima e recebeu uma microinjeção de azul de Evans (2,5% em solução salina) no ventrículo lateral. Os cérebros foram então removidos. A avaliação da injeção do azul de Evans no ventrículo lateral foi feita por visualização macroscópica. Os animais que apresentaram deslocamento ou bloqueio da cânula, durante a injeção ou padrões anormais de ganho de peso após a cirurgia foram excluídos do estudo.

#### 3.4. CURVA DOSE-RESPOSTA DA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR LPS E IL-1 $\beta$ .

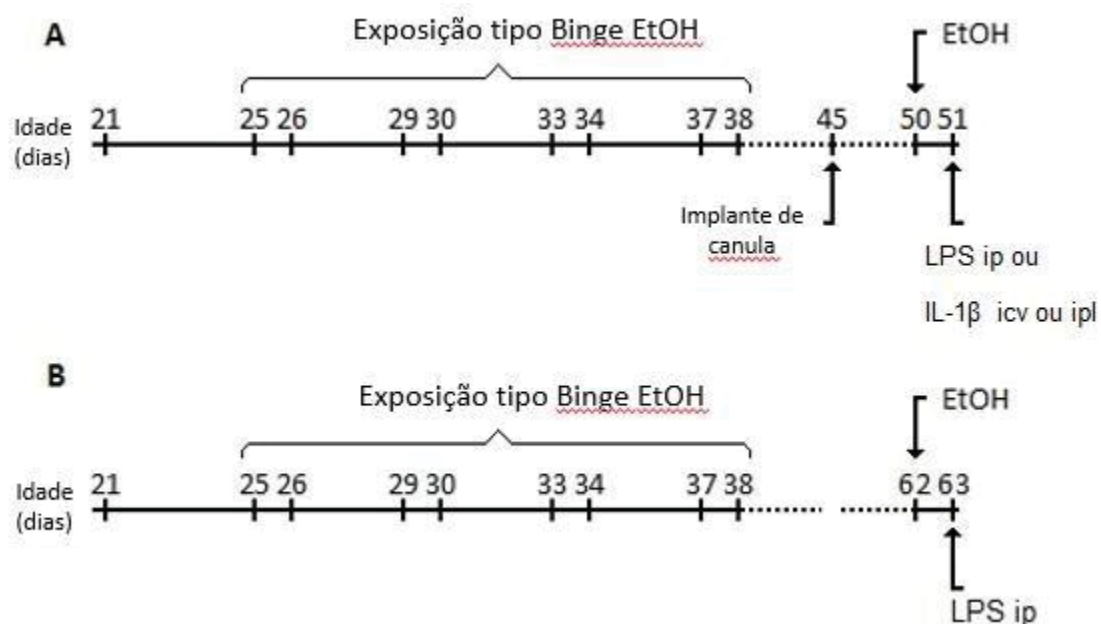
O limiar mecânico basal de animais adultos não expostos ao EtOH, foi medido como descrito no item 3.2. Após esta avaliação, os animais receberam 0,5, 5 e 50  $\mu$ g/kg de LPS i.p. (*E. coli*, 0111:B4, Sigmal-Aldrich, St. Louis, MA,

EUA), e o limiar mecânico foi novamente avaliado a cada hora até 6 h após a injeção de LPS. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de veículo (solução salina estéril). De forma semelhante, para a construção da curva dose-resposta para IL-1 $\beta$ , o limiar mecânico basal foi medido e os animais receberam IL- 1 $\beta$  (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) (1, 3 e 10 ng / 2  $\mu$ l, i.c.v.) e o limiar mecânico foi medido 3, 6 e 24 h após a injeção.

### 3.5. EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA NA HIPERALGESIA MECÂNICA

EtOH (3 g/kg, 25% p/v em soro fisiológico) foi administrado intraperitonealmente no PND 25 (grupo tratado com EtOH). O grupo de controle recebeu um volume equivalente de solução salina. Nos PND 26, 29, 30, 33, 34, 37 e 38, os animais receberam o mesmo tratamento (Fig. 2). Este padrão tipo *binge* foi escolhido com base em Lerma-Cabrera et al. (2013) e Forbes et al. (2013) para simular um padrão de intoxicação aguda que é comum durante a adolescência. Para avaliar a resposta hiperalgésica, os animais foram divididos em dois grupos. Em um grupo, 12 dias após a exposição ao EtOH (PND 50), os animais receberam uma dose adicional de EtOH ou água destilada por via oral (Fig. 2). No outro grupo, 24 dias após a exposição ao EtOH (PND 62), os animais receberam uma dose adicional de EtOH ou água destilada oralmente (Fig. 2). Os experimentos de hiperalgesia mecânica foram realizados no dia seguinte PND 51 ou PND 63, respectivamente) quando os animais foram tratados com solução

salina, LPS (5 e 50  $\mu\text{g}$  / kg, ip) ou IL-1 $\beta$  (3  $\mu\text{g}$  / 2  $\mu\text{l}$ , i.c.v.) ou IL-1 $\beta$  (1ng /  $\mu\text{l}$ , por via intraplantar (i.p.l.).



**Figura 2.** Representação esquemática da exposição tipo *binge* ao EtOH. Os animais receberam 3 g/kg intraperitonealmente ou o mesmo volume de solução salina nos PND indicados. Nos PND 50 ou 62, os animais receberam uma dose adicional de EtOH (3 g / kg) ou solução salina por via oral. Os experimentos foram realizados no dia seguinte.

Para avaliar o efeito da exposição ao etanol no limiar mecânico em alguns dos mesmos animais utilizados nos experimentos acima, foi feita a avaliação do limiar mecânico no PND 25 antes da primeira exposição ao EtOH, e esta avaliação foi comparada com os valores basais (antes de qualquer estímulo inflamatório) obtidos nos PND 51 e 63

### 3.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO EtOH NA HIPERALGESIA MECÂNICA

Em um grupo separado de animais, os ratos adultos não expostos a etanol receberam uma dose única de 3 g/kg EtOH (25% p/v em solução salina, p.o.) ou um volume equivalente de salina (grupo de controle) 24 h antes da administração de LPS. No dia seguinte, os animais receberam LPS (5 ou 50 µg/kg, i.p.) ou solução salina e a hiperalgesia mecânica foi avaliada.

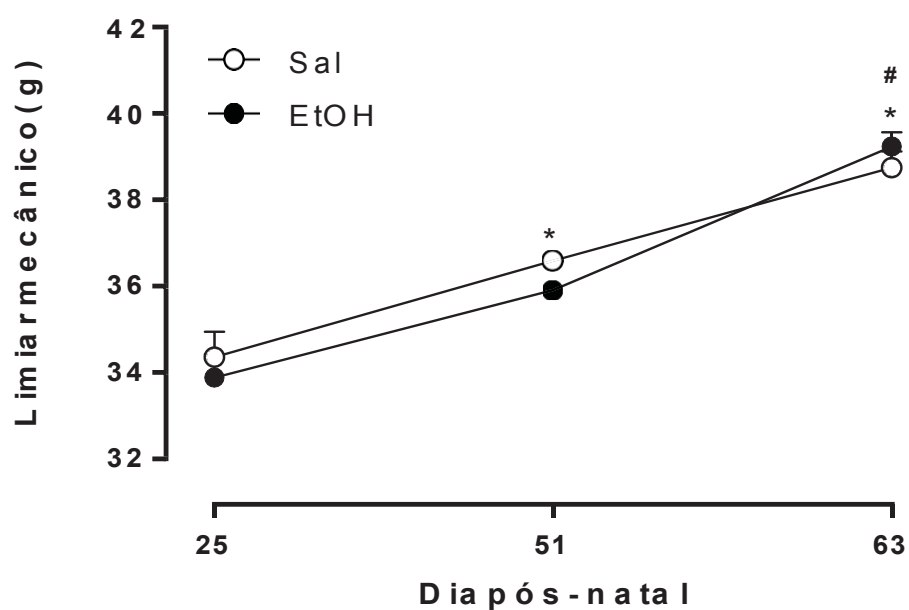
### 3.7. ANÁLISE DE DADOS

A hiperalgesia mecânica após a administração dos estímulos é apresentada como intensidade de hiperalgesia, que foi calculada como a diferença entre o limiar mecânico antes e após a injeção do estímulo. O limiar mecânico em diferentes idades e a hiperalgesia foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os resultados também são apresentados como área sob as curvas (em unidades arbitrárias, U.A.) da intensidade da hiperalgesia para melhor evidenciar as relações dose-resposta e a alteração total na hiperalgesia. As AUC foram analisadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados utilizando o software Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. LIMIAR MECÂNICO EM DIFERENTES IDADES

A Figura 3 mostra o limiar mecânico basal dos animais nos PND 25, 51 e 63. A ANOVA bidirecional mostrou efeitos significativos para o PND ( $F(2,44) = 60,39$ ,  $p < 0,0001$ ), mas não foram observadas diferenças significativas nos tratamentos entre os animais que receberam EtOH ou salina durante a adolescência ( $F(1,22) = 0,2991$ ,  $p > 0,05$ ) no PND 51 ou PND 63. Não foi observada interação ( $F(2,44) = 0,7869$ ,  $p > 0,05$ ).

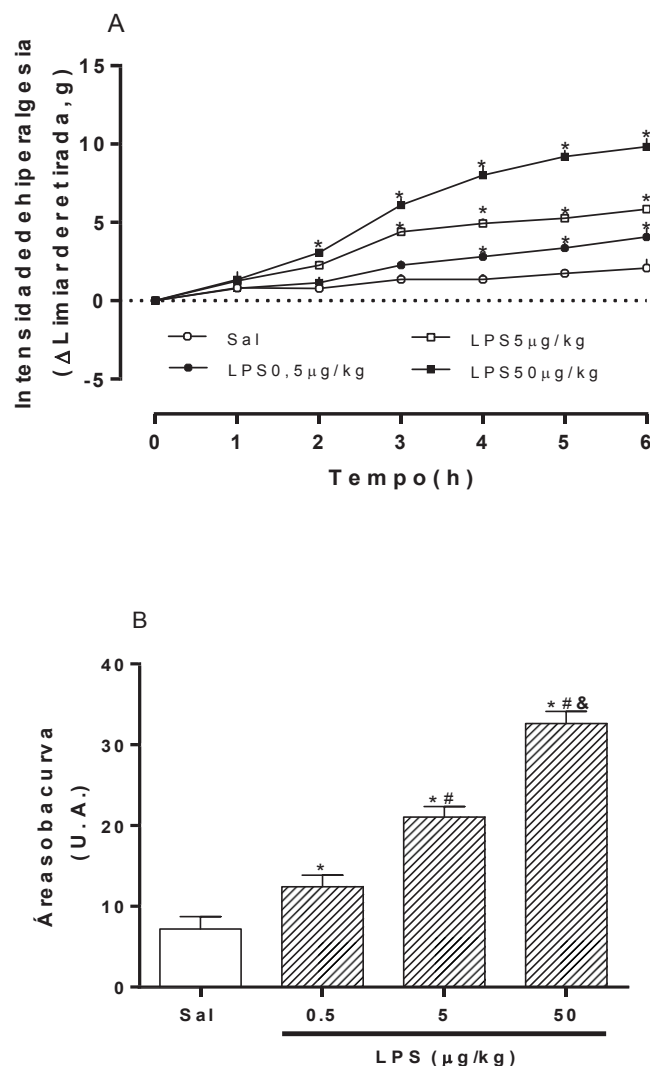


**Figura 3.** Influência do consumo de EtOH no modelo de *binge* sobre o limiar mecânico em ratos em diferentes idades. O limiar mecânico foi avaliado no PND 25 e depois foram expostos a EtOH ou solução salina (Sal) como descrito na figura 2. O limiar mecânico foi novamente avaliado no PND 51 e PND 63. Os dados mostram a média  $\pm$  e.p.m. do limiar mecânico em g (N = 7-17). \* Indica diferença significativa em relação ao PND 25, # denota diferenças significativas em comparação com o PND51,  $p < 0,05$ .

#### 4.2. HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR LPS

A administração intraperitoneal de LPS em animais não expostos ao EtOH induziu hiperalgesia mecânica dose-dependente significativa que teve início na 2ª hora e durou pelo menos até a 6ª hora (Figura 4A). A ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos para o tempo ( $F(6,120) = 275,3$ ,  $p < 0,0001$ ), tratamento ( $F(3,20) = 61,13$ ,  $p < 0,0001$ ) e interação ( $F(18,120) = 31,67$ ,  $p < 0,0001$ ). A relação dose-resposta foi avaliada calculando-se a área sob a curva observada na Fig. 4A e é mostrada na Fig. 4B. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo para o tratamento ( $F(3,20) = 59,33$ ,  $p < 0,001$ ), ou seja a administração de diferentes doses de LPS induziu hiperalgesia mecânica dose-dependente.



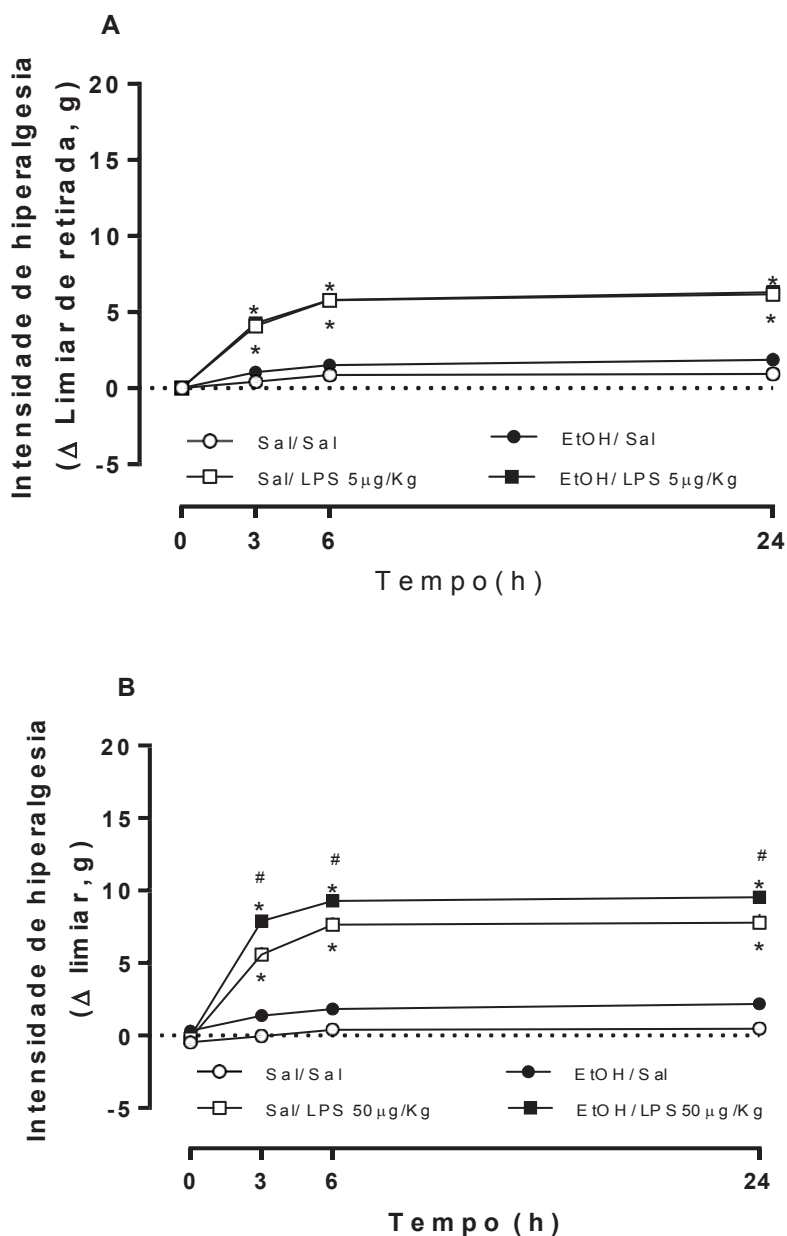


**Figura 4.** Hiperálgesia mecânica induzida por injeção sistêmica de LPS em ratos. O limiar mecânico foi avaliado em ratos adultos antes de qualquer procedimento (tempo 0). Os animais receberam injeção i.p. de lipopolissacarídeo (LPS) 0,5, 5,0 ou 50  $\mu$ g/kg ou o mesmo volume de solução salina (Sal) e o limiar mecânico foi novamente analisado a cada hora até 6 h. No painel A, os dados mostram a média  $\pm$  e.p.m.. da intensidade da hiperálgesia dada pela variação do limiar ( $\Delta$  limiar em g) antes e depois da administração de LPS (n = 6). O painel B mostra a área sob a curva (em unidades arbitrárias, U.A.) observada em A para melhor evidenciar a correlação dose-resposta. \* Indica diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com Sal, p < 0,05, # indica diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com LPS 0,5  $\mu$ g/kg, p < 0,05, & indica diferença significativa em comparação com o grupo tratado com LPS 5  $\mu$ g/kg, p < 0,05.

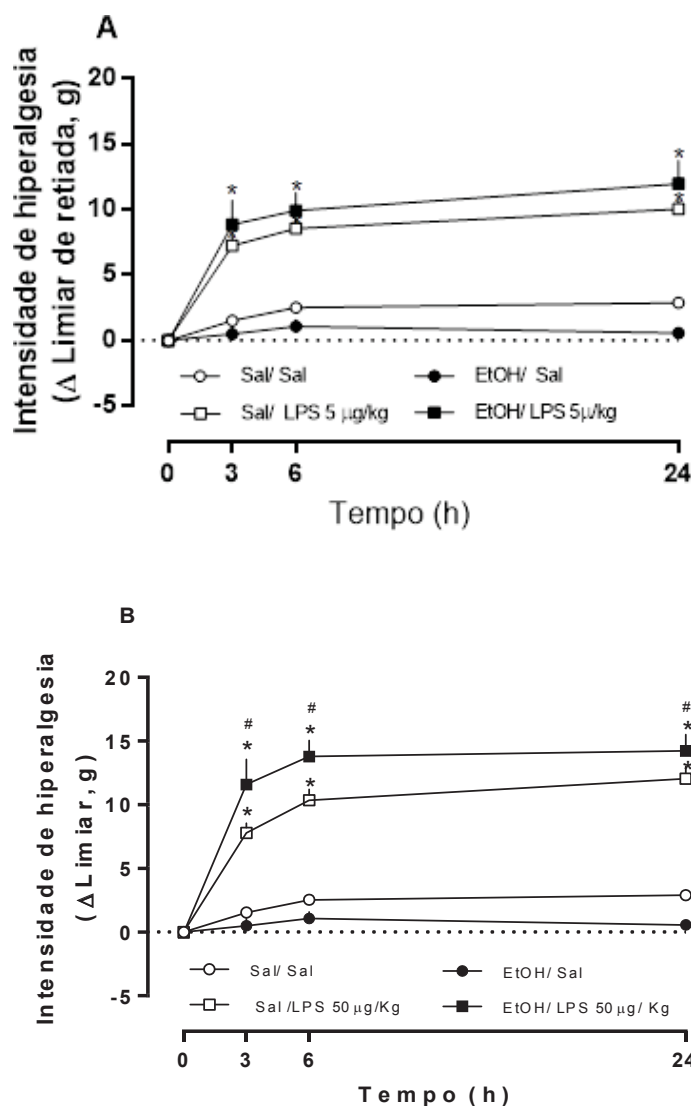
As doses de 5 e 50  $\mu\text{g/kg}$  foram selecionadas para experimentos posteriores em animais expostos ao EtOH no modelo de *binge*.

A administração de LPS 5  $\mu\text{g/kg}$  em animais expostos a EtOH na adolescência induziu uma hiperalgesia semelhante à observada em animais tratados com solução salina e observada na 3ª hora após a injeção e durou por pelo menos 24 horas em ambos os PND 51 e 63 (Figuras 5A e 6A). A ANOVA de duas vias apresentou efeitos significativos para tempo ( $F(3,129) = 395,8$ ,  $p < 0,0001$ ), tratamento ( $F(3,43) = 63,66$ ,  $p < 0,0001$ ) e interação ( $F(9,129) = 55,64$ ,  $p < 0,0001$ ) para o PND 51 e efeitos significativos para o tempo ( $F(3,57) = 98,12$ ,  $p < 0,0001$ ), para o tratamento ( $F(3,19) = 26,45$ ,  $p < 0,0001$ ) e interação ( $F(9,57) = 17,29$ ,  $p < 0,0001$ ) para PND 63.

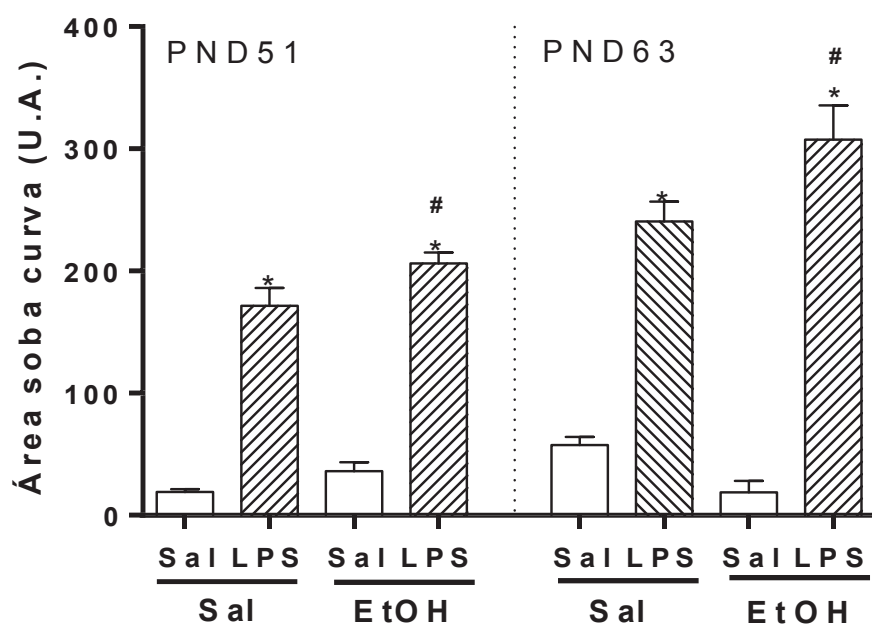
No entanto, a administração de LPS 50  $\mu\text{g/kg}$  induziu uma resposta hiperalgésica significativamente mais elevada na 3ª, 6ª e 24ª hora tanto no PND 51 (Fig. 5B) bem como no 63 (Fig. 6B). A ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos para o tempo ( $F(3,114) = 448,2$ ,  $p < 0,0001$ ), tratamento ( $F(3,38) = 137,9$ ,  $p < 0,0001$ ) e interação ( $F(9,114) = 95,41$ ,  $p < 0,0001$ ) para PND 51 e efeitos significativos para o tempo ( $F(3,66) = 89,85$ ,  $p < 0,0001$ ), tratamento ( $F(3,22) = 45,36$ ,  $p < 0,0001$ ) e interação ( $F(9,66) = 18,04$ ,  $p < 0,0001$ ) para PND 63. A Figura 7 mostra a área sob a curva, enfatizando as diferenças entre os grupos expostos ou não ao EtOH na adolescência. A ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas para o tratamento no PND 51 ( $F(3,38) = 139,7$ ,  $p < 0,0001$ ) e PND 63 ( $F(3,22) = 49,75$ ,  $p < 0,0001$ ). Animais controle que receberam salina não apresentaram diferenças quando expostos ou não ao EtOH.



**Figura 5.** Hiperalgesia mecânica induzida pela administração intraperitoneal de LPS em animais que receberam EtOH no modelo *binge*. O limiar mecânico foi avaliado nos animais antes de qualquer procedimento (tempo 0). Lipopolissacarídeo (LPS) 5  $\mu$ g/kg, 50  $\mu$ g/kg ou veículo (solução salina, Sal) foram administrados intraperitonealmente no PND 51 e o limiar mecânico foi novamente determinado nos tempos indicados. Os dados mostram a média  $\pm$  e.p.m. da intensidade da hiperalgesia dada pela alteração no limiar ( $\Delta$  limiar, em g) antes e depois da administração de LPS (n = 7-14). \* denota diferença significativa em comparação com o grupo tratado com Sal, # denota diferenças significativas em comparação com o grupo Sal LPS,  $p < 0,05$ .

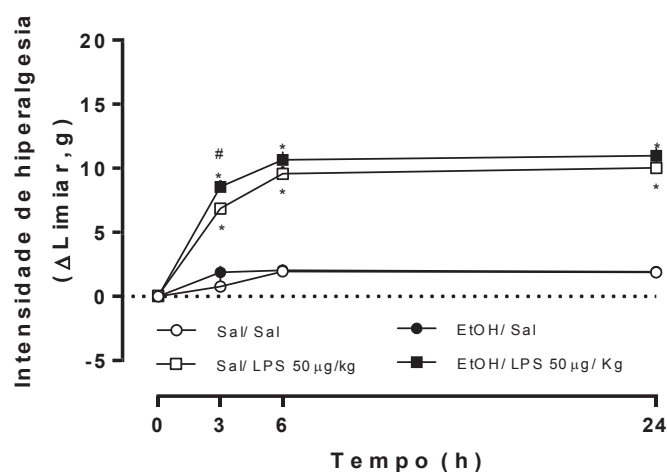


**Figura 6.** Hiperalgesia mecânica induzida pela administração intraperitoneal de LPS em animais que receberam EtOH no modelo *binge*. O limiar mecânico foi avaliado nos animais antes de qualquer procedimento (tempo 0). Lipopolissacarídeo (LPS) 5 µg/kg, 50 µg/kg ou veículo (solução salina, Sal) foram administrados intraperitonealmente no PND 63 e o limiar mecânico foi novamente determinado nos tempos indicados. Os dados mostram a média  $\pm$  e.p.m. da intensidade da hiperalgesia dada pela alteração no limiar ( $\Delta$  limiar em g) antes e depois da administração de LPS (n = 7-14). \* denota diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com Sal, # denota diferença significativa em comparação com o grupo Sal / LPS,  $p < 0,05$ .



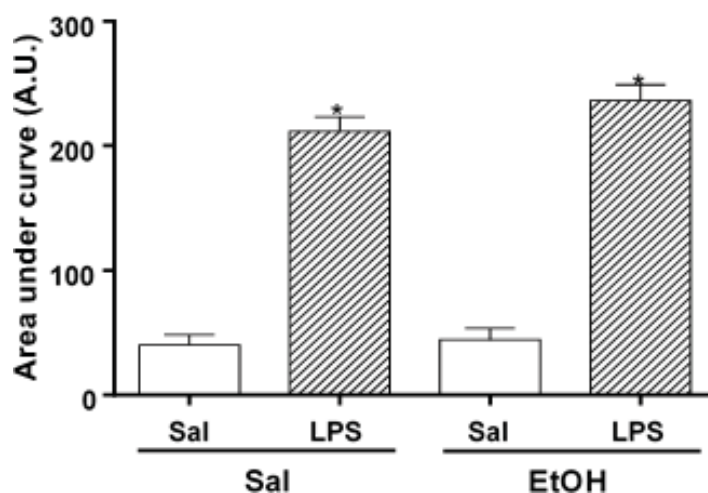
**Figura 7.** Área sob a curva (unidades arbitrárias, U. A.) observadas nas figuras 5B e 6B dos animais que receberam LPS 50 µg/kg. \* denota diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com Sal, # denota diferenças significativas em comparação com o respectivo grupo Sal/LPS,  $p < 0,005$ .

Com a finalidade de avaliar se estas diferenças entre os animais tratados com veículo e EtOH foram devidas à administração de EtOH no dia anterior à injeção de LPS, avaliamos esta resposta em animais que tinham recebido apenas uma administração aguda de EtOH ou veículo 24 h antes do LPS. A administração de LPS 50 µg/kg induziu uma hiperalgesia significativa em ambos os grupos, EtOH e animais tratados com salina ( $F(3,14) = 88,94$ ,  $p < 0,0001$ ) ao longo do tempo ( $F(3,42) = 279,4$ ,  $p < 0,0001$ ) (Fig. 8). A interação também foi significativa ( $F(9,42) = 44,70$ ,  $p < 0,0001$ ). Os animais tratados com EtOH apresentaram hiperalgesia mecânica mais elevada apenas 3 h após a injeção de LPS em comparação com animais que receberam solução salina. Em outros momentos (6 e 24 h), não houve diferença entre esses grupos (Fig. 8). Esta diferença não foi observada na análise de área sob a curva (Fig. 9). Nesta análise, houve diferenças significativas para o tratamento ( $F(3,4) = 88,49$ ,  $p < 0,0001$ ), mas não foram encontradas diferenças entre os animais expostos ou não ao EtOH e que receberam LPS (Figura 9).



**Figura 8.** Hiperalgisia mecânica induzida por administração intraperitoneal de LPS em animais submetidos a exposição aguda ao EtOH. O limiar mecânico foi avaliado nos animais antes de qualquer procedimento (tempo 0). O LPS 50 µg/kg ou veículo (água) foram administrados por via intraperitoneal e o limiar mecânico foi novamente determinado nos tempos indicados. Os dados mostram a média  $\pm$  e.p.m. da intensidade da hiperalgisia dada pela variação no limiar ( $\Delta$  limiar, em g) antes e após a administração de LPS (n = 7-14). \* Indica diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com Sal, # denota diferenças significativas em comparação com o grupo Sal/ LPS,  $p < 0,05$ .





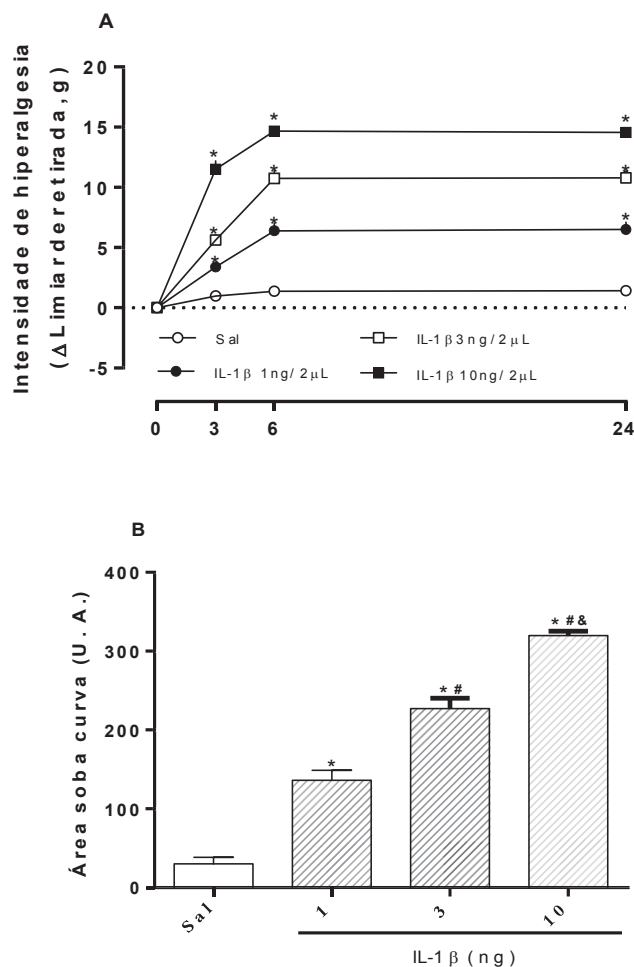
**Figura 9.** Área sob a curva (unidades arbitrárias, U.A.) observadas na Figura 7. \* denota diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com Sal,  $p < 0,05$

#### 4.3 HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR IL-1 $\beta$

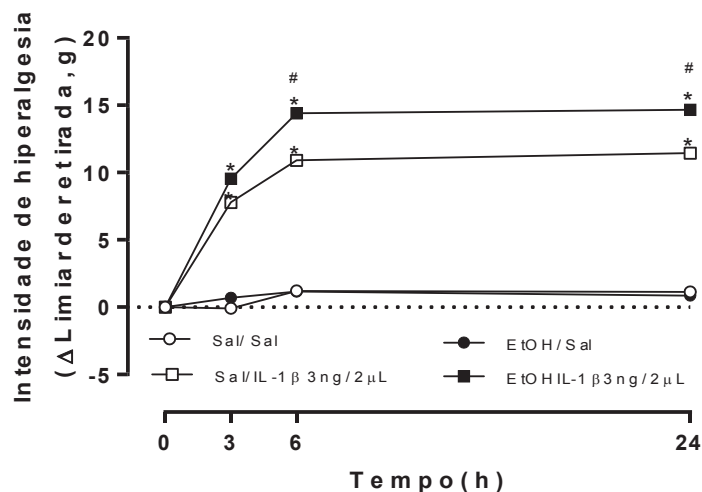
Decidimos então avaliar se esta hiperalgesia mecânica diferencial entre os animais expostos à salina e expostos ao EtOH no modelo *binge* durante a adolescência poderia também ser observada após a injeção de um dos mediadores mais importantes liberados após a injeção de LPS, a IL-1 $\beta$ . Adicionalmente, para verificar se estas diferenças eram devidas a alterações no sistema nervoso central após exposição ao EtOH, optou-se por injetar IL-1 $\beta$  via i.c.v..

A injeção i.c.v. de diferentes doses de IL-1 $\beta$  induziu hiperalgesia mecânica dose-dependente (Fig. 10A). A ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos para tempo ( $F(3,66) = 512,5$ ,  $p < 0,0001$ ), tratamento ( $F(3,22) = 135,1$ ,  $p < 0,0001$ ) e interação ( $F(9,66) = 68,44$ ,  $p < 0,0001$ ). A análise da área sob a curva revelou uma resposta dose-dependente (Fig. 10B,  $F(3,22) = 123,1$ ,

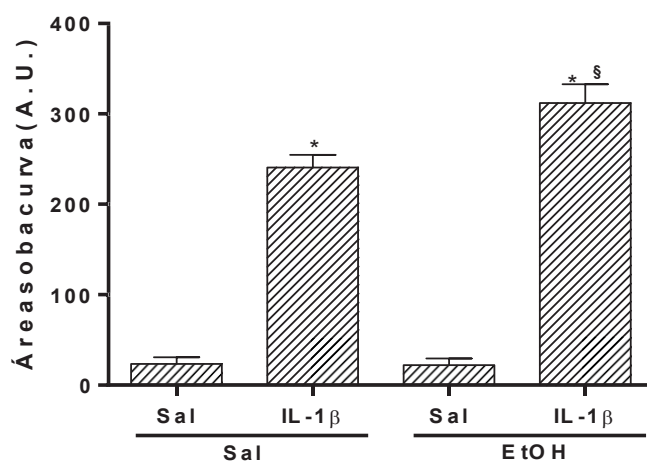
$p < 0,0001$ ). A administração i.c.v. de 3 ng/ 2 $\mu$ L de IL-1 $\beta$  induziu uma hiperalgesia significativa em animais tratados com solução salina e EtOH com efeitos significativos para tempo ( $F(3,45) = 210,4$ ,  $p < 0,0001$ ), tratamento ( $F(3,15) = 126,1$ ,  $p < 0,0001$ ) e interação ( $F(9,45) = 52,53$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 11). A hiperalgesia mecânica induzida por IL-1 $\beta$  em animais expostos ao EtOH foi significativamente maior do que aquela observada em animais tratados somente com o veículo às 6 e 24 h após a administração de LPS. Este resultado foi confirmado pela análise da área sob as curvas mostradas na figura 12. A ANOVA de uma via mostrou efeitos significativos para tratamento ( $F(3,15) = 111,9$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 10.** Hiperálgesia mecânica induzida por injeção intracerebroventricular de IL-1 $\beta$  em ratos não expostos ao EtOH. No painel A, avaliou-se o limiar mecânico basal de ratos *naïve* e depois da injeção i.c.v. de IL-1 $\beta$  1, 3 ou 10 ng ou solução salina (Sal). Os dados mostram a média  $\pm$  e.p.m. da intensidade da hiperálgesia dada pela alteração no limiar ( $\Delta$  limiar em g) antes e depois da administração de IL-1 $\beta$  (n = 7-14). O painel B mostra a área sob a curva (unidades arbitrárias, U.A.) observada em A para esclarecer a correlação dose-resposta. \* Indica diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com Sal, p <0,05, # indica diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com IL-1 $\beta$  1 ng, p <0,05. & Indica diferença significativa em comparação com o grupo tratado com IL-1 $\beta$  3 ng, p <0,05.



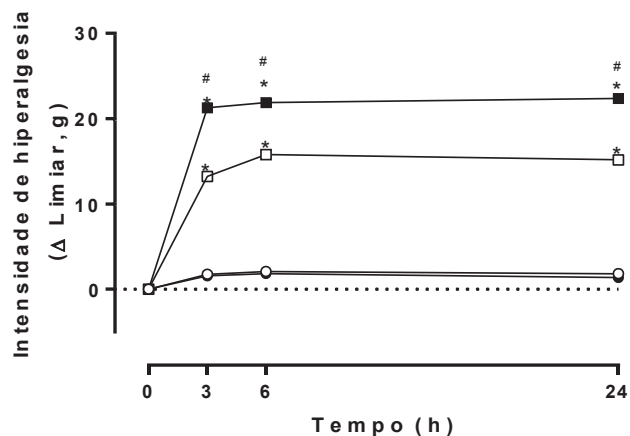
**Figura 11.** Hiperalgesia mecânica induzida por injeção intracerebroventricular de IL-1 $\beta$  em animais que receberam EtOH no modelo *binge*. O limiar mecânico dos animais foi avaliado antes de qualquer procedimento (tempo 0). A IL-1 $\beta$  3 ng ou solução salina (Sal) foi injetada via i.c.v. no PND51 após exposição em *binge* ao EtOH ou Sal e o limiar mecânico foi avaliado 3, 6 e 24 h após a injeção de IL-1 $\beta$ . Os dados mostram a média  $\pm$  e.p.m. da intensidade da hiperalgesia que é dada pela alteração no limiar ( $\Delta$  limiar, em g) antes e depois da administração de IL-1 $\beta$  ( $n = 7-14$ ). \* Indica diferenças significativas em comparação com o grupo tratado apenas com Sal, # denota diferenças significativas em comparação com o grupo Sal / IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ .



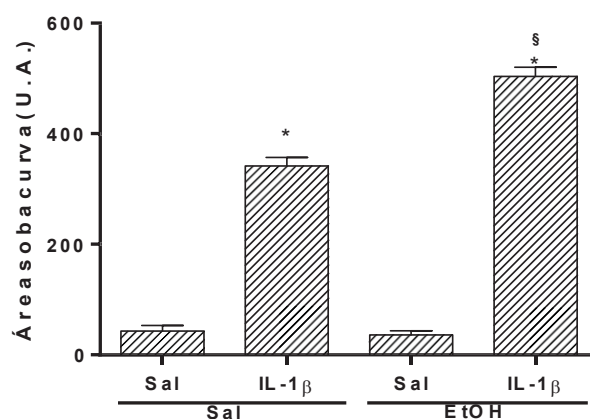
**Figura 12.** Área sob a curva (unidades arbitrárias, U.A.) observadas na Figura 10. \* denota diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com Sal,  $p < 0,05$ , § indica diferença significativa em comparação com o grupo salina IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ .

A partir desses resultados decidiu-se avaliar se este aumento na sensibilidade a um estímulo doloroso poderia refletir-se também após a administração periférica do estímulo. Assim, optou-se por administrar a IL-1 $\beta$  por via intraplantar (i.p.l.).

A administração i.pl. de IL-1 $\beta$  também induziu hiperalgesia mecânica significativa em animais tratados com veículo ou EtOH com efeitos significativos para tempo ( $F(3,51)= 512,2$ ,  $p < 0,0001$ ), tratamento ( $F(3,17)= 300,2$ ,  $p < 0,0001$ ) e interação ( $F(9,51)= 127,1$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 13). A hiperalgesia mecânica induzida por IL-1 $\beta$  em animais expostos ao EtOH foi significativamente maior na 3<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> horas do que a observada em animais do grupo Sal. Este resultado foi confirmado pela análise da área sob as curvas mostradas na figura 14. A ANOVA de uma via mostrou efeitos significativos para tratamento ( $F(3,15) = 256,5$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 13.** Hiperalgesia mecânica induzida pela administração intraplantar (i.p.l.) de IL-1 $\beta$  em animais que receberam *binge* EtOH. O limiar mecânico foi avaliado nos animais antes de qualquer procedimento (tempo 0). A solução de IL-1 $\beta$  1ng/ 100 $\mu$ L ou veículo (solução salina, Sal) foi administrado via intraplantar no PND 51 e o limiar mecânico foi novamente determinado nos pontos de tempo indicados. Os dados mostram a média  $\pm$  e.p.m. da intensidade da hiperalgesia dada pela alteração no limiar ( $\Delta$  limiar) em g antes e depois da administração de IL-1 $\beta$  em g. \* denota diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com Sal, # denota diferenças significativas em comparação com o respectivo grupo Sal / IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ .



**Figura 14.** Área sob a curva (unidades arbitrárias, U.A.) observadas na Figura 13. \* denota diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com Sal,  $p < 0,05$ , § indica diferença significativa em comparação com o grupo salina IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

O principal achado no presente estudo apoia a nossa hipótese de que a administração intermitente de EtOH durante a adolescência altera a hiperalgesia mecânica induzida por LPS e IL-1 $\beta$ . Este efeito foi evidente durante dias após a retirada do EtOH e foi diferente do observado para a resposta febril (TELLES, 2016)

Os efeitos da exposição ao EtOH na resposta de dor em diferentes idades e com diferentes padrões de administração de EtOH (isto é, agudo vs. crônico) foram previamente relatados. Dina e colaboradores (2006), utilizando diferentes protocolos, mostraram que a administração consecutiva de EtOH a ratos seguida por períodos de suspensão resultou em uma hiperalgesia mecânica que durou pelo menos 12 dias após a sua retirada. Similarmente, Bergeson e colaboradores (2016) mostraram que a administração de EtOH, a curto prazo, induziu hiperalgesia mecânica e térmica ao frio, e aumentou a nocicepção induzida por formalina, em camundongos. O limiar mecânico e térmico ao frio retornou aos valores basais 2 e 3 dias após a cessar a exposição ao EtOH em camundongos machos e fêmeas, respectivamente.

No presente estudo, iniciando nossos experimentos com animais jovens, observamos que o limiar mecânico aumentou com a idade. Como esperado, animais mais velhos apresentaram maior limiar mecânico. No entanto, diferentemente dos estudos anteriores, não observamos diferenças entre o limiar de animais expostos a solução salina e ao EtOH em qualquer idade analisada, o que sugere que esses animais não apresentavam hiperalgesia induzida por



EtOH. É importante enfatizar que a exposição ao EtOH nos estudos anteriores ocorreu em animais adultos. Esta diferença entre estudos sugere que o protocolo de exposição *binge* ao EtOH durante a adolescência, utilizado neste estudo, não induziu alterações no limiar mecânico dos animais devido ao período de vida em que os mesmos foram expostos, ou ainda devido à dose de EtOH administrada. Outra possibilidade é a de que este protocolo tenha induzido uma resposta hiperalgésica que durou menos de 12 dias, e por este motivo não foi possível com o protocolo utilizado detectá-la. O motivo exato dessa discrepância ainda é desconhecido.

Como mencionado anteriormente, Bergerson e colaboradores (2016) observaram que a exposição ao EtOH também potenciou a nocicepção induzida por formalina em camundongos. Este dado, no entanto, é importante pois sugere que a exposição ao etanol no modelo de *binge* durante a adolescência não altera a percepção de um estímulo mecânico em condições normais, mas poderia alterar a percepção deste estímulo em condições patológicas. No presente estudo, verificou-se que de maneira similar, a exposição ao EtOH durante a adolescência produziu alterações semelhantes na hiperalgesia mecânica induzida por LPS e IL-1 $\beta$  (isto é, aumento da hiperalgesia mecânica observada nos PND 51 e PND 63).

Assim é possível que, embora o modelo de *binge* utilizado neste estudo não seja capaz de promover hiperalgesia por si, a exposição ao EtOH seja capaz de produzir algumas mudanças no sistema nervoso central que resultem numa resposta hiperalgésica

exacerbada. Acreditamos que esta alteração possa ocorrer no sistema nervoso central (embora não exclusivamente neste local) pois a administração i.c.v. de IL-1 $\beta$  promoveu resultados similares ao do LPS perifericamente.

Estudos anteriores também sugeriram uma ativação microglial e uma maior expressão de receptores NMDA ou uma disfunção nos receptores opioidérgicos MOR na superfície dorsal do corno dorsal da medula espinal (NARITA et al. 2007a, NARITA et al., 2007b) que poderiam efetivamente alterar a percepção do estímulo doloroso. Estes autores associaram estas alterações à hiperalgesia induzida pelo próprio EtOH. Embora não tenhamos observado esta hiperalgesia como discutido anteriormente, é possível que algumas destas alterações também ocorram no modelo de *binge* utilizado neste estudo e que, embora não sejam perceptíveis em condições basais, tornam-se evidentes após a administração de LPS ou IL-1 $\beta$ .

A exposição ao EtOH também perturba a função barreira do intestino. Os componentes bacterianos podem entrar na circulação, elevando os níveis séricos de LPS em indivíduos com alcoolismo, que podem ativar receptores do tipo *Toll* (TLR4) (SZABO e LIPPAI, 2014). Evidências sugerem que o EtOH produz efeitos biológicos principalmente através da interação com os lípideos de membrana, refletindo em um desequilíbrio entre os efeitos anti-inflamatórios do EtOH e os efeitos pró-inflamatórios das bactérias que entram na circulação devido a um déficit da função barreira no trato gastrointestinal (SZABO et al., 2007). O cérebro adolescente está em constante desenvolvimento através da produção de axônios e sinapses que conferem plasticidade no desenvolvimento de circuitos neuronais. Estes circuitos são moldados para atender às necessidades ambientais que levam à maturidade quando adultos. Tal período

de remodelação pode tornar-se susceptível a insultos externos (por exemplo, EtOH ou bactérias), modificando assim não só estas funções cognitivas, mas também a resposta febril e outras respostas neuroimunológicas (CREWS et al., 2015). Mais uma vez, esses insultos externos poderiam ser responsáveis por essas alterações (ativação microglial, alterações na expressão de NR2B ou disfunção de MOR, por exemplo) que podem contribuir para o aumento do estado hiperalgésico.

A exposição ao EtOH por si provoca neuroinflamação e pode alterar os níveis de citocinas centrais e periféricas mesmo na ausência de um estímulo imunológico. Uma dieta líquida contendo EtOH durante 5 semanas aumentou os níveis centrais de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (LIPPAI et al., 2013) A expressão de citocinas mais TLR4 (ALFONSO-LOECHES et al., 2010) e ativação do inflamassomo do receptor de domínio 3 de ligação a nucleotídeos (NALP3) (LIPPAI et al., 2013). O *knockdown* destes e de outros componentes das vias de sinalização LPS/IL-1 $\beta$  inverteu esta resposta. Os ratos adolescentes que foram tratados com EtOH usando um protocolo semelhante ao utilizado no presente estudo exibiram mudanças na sinalização de TLR4 que estavam ligadas a disfunção cognitiva de longa duração, incluindo reconhecimento de objetos (MONTESINOS et al., 2015). De fato, estudos in vitro (FERNANDEZ-LIZARBE et al., 2008) mostraram que, enquanto baixas concentrações de EtOH ativam macrófagos recrutando TLR4/IL-1R1 em microdomínios de *rafts* lipídicos, concentrações mais altas inibem essas células interrompendo esses complexos. Nosso estudo anterior mostrou que os macrófagos periféricos parecem ter se recuperado após 12 dias de retirada de EtOH porque os níveis sanguíneos de IL-1 $\beta$  são semelhantes (TELLES et al., 2017). Contudo, identificamos no mesmo estudo que os níveis

centrais de IL-1 $\beta$  foram reduzidos em animais expostos a EtOH após injeção de LPS, sugerindo que a exposição a EtOH durante a adolescência pode afetar a expressão ou síntese desta citocina no cérebro. Assim, uma possível interrupção das vias de sinalização TLR4 e LPS/IL-1 $\beta$  no cérebro não é uma explicação razoável para os efeitos da exposição ao EtOH na hiperalgesia uma vez que esta resposta foi aumentada em animais expostos a EtOH.

Considerando que houve uma alteração no sistema nervoso central para esta hiperalgesia exacerbada em animais expostos ao EtOH, seria esperado que estímulos administrados em outros locais que não diretamente no sistema nervoso central também estivessem alterados. Confirmando esta hipótese, a administração periférica de IL-1 $\beta$  diretamente na pata do animal também promoveu uma hiperalgesia maior em animais expostos ao EtOH na adolescência.

Em conjunto, estes dados sugerem que a exposição em *binge* na adolescência produz uma maior sensibilidade a estímulos dolorosos tanto periféricos como centrais.

As alterações observadas para hiperalgesia (demonstradas no presente estudo) e febre (TELLES et al., 2017) após a exposição ao EtOH foram opostas: enquanto a exposição do tipo *binge* ao EtOH, intensificou a hiperalgesia, a mesma foi capaz de reduzir a resposta febril. É importante salientar que os estímulos utilizados foram os mesmos e nas mesmas doses. Curiosamente, enquanto a redução da febre foi observada apenas no PND 51 e foi restaurada no PND 63, o aumento da resposta hiperalgésica foi observado tanto no PND 51 quanto no PND 63. Estes resultados sugerem que diferentes mecanismos estão

envolvidos em ambos os eventos. Eles também confirmam que os mecanismos centrais estão envolvidos nos efeitos da exposição ao EtOH, uma vez que a IL-1 $\beta$  foi administrada diretamente no sistema nervoso central. Portanto, é importante ressaltar que, embora as mudanças na resposta febril tenham durado algum tempo, sem persistir até a idade adulta, as alterações na hiperalgesia podem ter maior duração após a interrupção da exposição ao EtOH e se prolongar até a vida adulta.

É importante ressaltar que no nosso estudo anterior não observou-se alterações significativas nos parâmetros hematológicos, sugerindo que os animais, embora apresentassem menor peso corporal, mantinham estado de saúde normal (TELLES et al., 2017). Também não foram observadas alterações no número ou na viabilidade dos macrófagos peritoneais (TELLES et al., 2017), sugerindo que a possível alteração destas células não foi responsável pela alteração na resposta hiperalgésica observada nos animais após a exposição ao EtOH durante a adolescência.

Estudos anteriores observaram alterações nos macrófagos peritoneais. PASCUAL et al. (2011), mostraram que o tratamento agudo com EtOH ativou a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos, enquanto que o tratamento crônico reduziu a expressão superficial do complexo de histocompatibilidade e principalmente a ativação de células T sugerindo uma ativação de macrófagos. No entanto, a exposição in vitro de macrófagos ao EtOH induziu efeitos opostos reduzindo a expressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 e suprimindo a atividade de proteassoma conduzindo à supressão da Classe de MHC I (MURALIDHARAN et al., 2014, D'SOUZA et al., 2013). Nestes estudos, a exposição ao EtOH foi realizada durante um curto período e as alterações (ativação ou supressão)

também tiveram curta duração. Utilizando o mesmo modelo de exposição ao EtOH do tipo *binge* demonstramos anteriormente que os níveis de IL-1 $\beta$  plasmáticos não eram significativamente diferentes entre animais expostos somente ao veículo ou ao EtOH, confirmando assim que, no nosso modelo, estes macrófagos são funcionalmente semelhantes (TELLES et al., 2017). Deste modo, o intervalo de 12 ou 25 dias entre a cessação da exposição ao EtOH e a administração de LPS parece ser suficiente para restaurar a funcionalidade destas células. No entanto, outros estudos são necessários para determinar se outros mecanismos periféricos podem também estar envolvidos na hiperalgesia mecânica exacerbada que é observada após a exposição ao EtOH.

Estas alterações na hiperalgesia mecânica não podem ser atribuíveis à exposição aguda de EtOH porque não foram observadas alterações nos ratos que receberam EtOH no dia anterior à injeção de LPS em comparação com os ratos que receberam solução salina. Este resultado corrobora um estudo anterior que observou que a exposição ao EtOH de um dia não induziu hiperalgesia mecânica no dia seguinte nos animais (DINA et al., 2006). Adicionalmente, a administração de LPS não induziu um aumento no índice hiperalgésico desses animais.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a exposição *binge* ao EtOH durante a adolescência em ratos pode produzir alterações no sistema nervoso central que aumentam a sensibilidade mecânica nas patas após um estímulo sistêmico nocivo (LPS), que pode ter consequências importantes sobre a resposta de dor, impactando a qualidade de vida desses indivíduos, mesmo após a cessar a exposição ao EtOH.

## 7.REFERÊNCIAS

- Aanonsen, L.M., S. Lei, and G.L. Wilcox. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*,. 41(3): p. 309-21,1990.
- Afshar M, Richards S, Mann D, Cross A, Smith GB, Netzer G, Kovacs E, Hasday J. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. *Alcohol* 49:57-64, 2015.
- Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci* 15;19(6):2181-6, 1999.
- Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci* 30:8285-8295, 2010.
- Bergeson SE, Blanton H, Martinez JM, Curtis DC, Sherfey C, Seegmiller B, Marquardt PC, Groot JA, Allison CL, Bezboruah C, Guindon J. Binge Ethanol Consumption Increases Inflammatory Pain Responses and Mechanical and Cold Sensitivity: Tigecycline Treatment Efficacy Shows Sex Differences. *Alcohol Clin Exp Res* 40:2506-2515, 2016.
- Brown LA, Cook RT, Jerrells TR, Kolls JK, Nagy LE, Szabo G, Wands JR, Kovacs EJ. Acute and chronic alcohol abuse modulate immunity. *Alcohol Clin Exp Res*.30:1624–1631, 2006.
- Campbell, J.N., Meyer, R.A., Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 52, 77–92, 2006.
- Cook RT. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system—a review. *Alcohol Clin Exp Res*.; 22:1927–1942, 1998.



Courtney KE, Polich J. Binge drinking effects on EEG in young adult humans. *International journal of environmental research and public health* 7:2325-2336, 2010.

Crews FT, Sarkar DK, Qin L, Zou J, Boyadjieva N, Vetreno RP. Neuroimmune Function and the Consequences of Alcohol Exposure. *Alcohol research: current reviews* 37:331-341, 344-351, 2015.

Crews, F.T., Bechara, R., Brown, L.A., Guidot, D.M., Mandrekar, P., Oak, S., Qin, L., Szabo, G., Wheeler, M., Zou, J. Cytokines and alcohol. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 30, 720–730, 2006.

Crews, F.T., Nixon, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol and Alcoholism*, Oxford, Oxfordshire, 44, 115–127, 2009.

Cunha, F.Q., et al., Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol*, 104(3): p. 765-7, 1991.

Cunha, F.Q., et al., The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 107(3): p. 660-4. 1992.

Dantzer R, Connor J C O, Freund G G, Johnson R W, Kelley K W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* . 9 : 46–56, 2008.

Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun*;15:7–24, 2001.

Dina OA, Messing RO, Levine JD. Ethanol withdrawal induces hyperalgesia mediated by PKCepsilon. *Eur J Neurosci* 24:197-204, 2006.

D'Souza AJ, Desai SD, Rudner XL, Kelly MN, Ruan S, Shellito JE. Suppression of the macrophage proteasome by ethanol impairs MHC class I antigen processing and presentation. *PLoS One* 8: e 56890, 2013.

Egli M, Koob GF, Edwards S. Alcohol dependence as a chronic pain disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 36:2179–2192, 2012.

Eijkelkamp N, Linley JE, Torres JM, Bee L, Dickenson AH, Gringhuis M, Minett Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Gascon MS, Blanco A, Guerri C. Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Mol Immunol* 45:2007-2016, 2008.

Eijkelkamp, N., Linley, J.E., Torres, J.M., Bee, L., Dickenson, A.H., Gringhuis, M., Minett, M.S., Hong, G.S., Lee, E., Oh, U., Ishikawa, Y., Zwartkuis, F. J., Cox, J. J. & Wood, J. N. A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. *Nat Commun*, 4, 1682, 2013.

Ferrari LF, Levine JD. Alcohol consumption enhances antiretroviral painful peripheral neuropathy by mitochondrial mechanisms. *Eur J Neurosci* 32:811818, 2010.

Ferreira, S.H., B.B. Lorenzetti, and S. Poole, Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 110(3): p. 1227-31, 1993.

Ferreira, S.H., et al., Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, 334(6184): p. 698-700, 1988.

Fine JG, Sung C . Neuroscience of child and adolescent health development. *Journal of counseling psychology* 61:521-527, 2014.

Forbes A, Cooze J, Malone C, French V, Weber JT. Effects of intermittent binge alcohol exposure on long-term motor function in young rats. *Alcohol* 47:95-102, 2013.

Fowler AK, Thompson J, Chen L, Dagda M, Dertien J, Dossou KS, Moaddel R, Bergeson SE, Kruman, II. Differential sensitivity of prefrontal cortex and ocampus to alcohol-induced toxicity. PLoS One 9:e106945, 2014.

Fu KY, et al. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw Brain Res, 825(1-2): p. 59-67, 1999.

Gatch, MB. Nitrendipine blocks the nociceptive effects of chronically administered ethanol. Alcohol Clin Exp Res 26:1181-1187, 2002.

Gonzalez-Sepulveda M, Pozo OJ, Marcos J, Valverde O. Chronic pain causes a persistent anxiety state leading to increased ethanol intake in CD1 mice. Journal of psychopharmacology, 30:188-203, 2016.

Goral J, Karavitis J, Kovacs EJ. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. Alcohol 42:237-247, 2008.

Happel KI, Nelson S. Alcohol, immunosuppression, and the lung. Proc. Am. Thorac. Soc.;2(5):428–432, 2005.

Hucho TB, Dina OA, Levine JD. Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. J Neurosci. 25(26):6119-26, 2005.

Hunt, S.P. and J. Rossi. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,. 308(1136): p. 283-9, 1985.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD), 2013.

Johnson RW, Veterinary Immunology and Immunopathology 443-450, 87, 2002.

Julius, D. and A.I. Basbaum, Molecular mechanisms of nociception. Nature, 413(6852): p. 203-10, 2001.

Kehl LJ, Kovacs KJ, Larson AA. Tolerance develops to the effect of lipopolysaccharides on movement-evoked hyperalgesia when administered chronically by a systemic but not an intrathecal route. *Pain*.;111:104–115, 2004.

Kuner, R., Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*,16(11): p. 1258-66, 2010.

Wei F, Qiu CS, Kim SJ, Muglia L, Maas JW, Pineda VV, Xu HM, Chen ZF, Storm DR, Muglia LJ, Zhuo M. Genetic elimination of behavioral sensitization in mice lacking calmodulin-stimulated adenylyl cyclases. *Neuron*, 36(4):713-26, 2002.

Lerma-Cabrera JM, Carvajal F, Alcaraz-Iborra M, de la Fuente L, Navarro M, Thiele TE, Cubero I. Adolescent binge-like ethanol exposure reduces basal alpha-MSH expression in the hypothalamus and the amygdala of adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 110:66-74, 2013.

Lippai D, Bala S, Petrasek J, Csak T, Levin I, Kurt-Jones EA, Szabo G. Alcohol induced IL-1beta in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. *J Leukoc Biol* 94:171-182, 2013.

Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137(3): p. 473-7, 2008.

Lopez OL, Becker JT, Dew MA, Caldararo R Risk modifiers for peripheral sensory neuropathy in HIV infection/AIDS. *Eur J Neurol* 11:97-102, 2004.

MacGregor RR, Loria DB. Alcohol and infection. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.*;17:291–315, 1997.

Maier, S.F., et al., Interleukin-1 mediates the behavioral hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. *Brain Res.*, 623(2): p. 321-4, 1993.

Masten AS, Faden VB, Zucker RA, Spear LP. A developmental perspective on underage alcohol use. *Alcohol Res Health* 32:3-15, 2009.

Mellion M, Gilchrist JM, De La Monte S. Alcohol-related peripheral neuropathy: nutritional, toxic, or both?. *Muscle and Nerve.*; 43:309–316, 2011.

Messingham KA, Faunce DE, Kovacs EJ. Alcohol, injury, and cellular immunity *Alcohol.* 28(3):137–149, 2002.

Millan, MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57(1): p. 1-164,1999.

Miyoshi K, Narita M, Narita M, Suzuki T. Involvement of mGluR5 in the ethanolinduced neuropathic pain-like state in the rat. *Neurosci Lett* 410:105-109., 2006.

Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain research reviews.*;51(2):240–64, 2006.

Montesinos J, Pascual M, Pla A, Maldonado C, Rodriguez-Arias M, Minarro J, Guerri C. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain Behav Immun* 45:233-244, 2015.

Moyle GJ, Sadler M. Peripheral neuropathy with nucleoside antiretrovirals: risk factors, incidence and management. *Drug safety* 19:481-494, 1998.

Muralidharan S, Ambade A, Fulham MA, Deshpande J, Catalano D, Mandrekar P. Moderate alcohol induces stress proteins HSF1 and hsp70 and inhibits proinflammatory cytokines resulting in endotoxin tolerance. *J Immunol* 193:1975-1987, 2014.

Narita M, Miyoshi K, Narita M, Suzuki T. Changes in function of NMDA receptor NR2B subunit in spinal cord of rats with neuropathy following chronic ethanol consumption. *Life Sci* 80:852-859, 2007a.

Narita M, Miyoshi K, Narita M, Suzuki T. Functional reduction in mu-opioidergic system in the spinal cord under a neuropathic pain-like state following chronic ethanol consumption in the rat. *Neuroscience* 144:777-782, 2007b.

Narita M, Miyoshi K, Narita M, Suzuki T. Involvement of microglia in the ethanol-induced neuropathic pain-like state in the rat. *Neurosci Lett* 414:21-25, 2007c.

Nath A, Hauser KF, Wojna V, Booze RM, Maragos W, Prendergast M, Cass W, Turchan JT. Molecular basis for interactions of HIV and drugs of abuse. *J Acquir Immune Defic Syndr* 31 Suppl 2:S62-69, 2002.

Nelson S, Kolls, JK. Science and Society: Alcohol, host defence and Society *Nat Rev Immunol*, 2:3, 205-209, 2002.

Ortiz-Plata A, Palencia G, Garcia E, Perez R, Sotelo J. Ultrastructural changes in limb distal nerves of rats with alcoholism and/or malnutrition before and after dietary correction. *J Appl Toxicol* 18:89–92, 1998.

Pascual M, Fernandez-Lizarbe S, Guerri C. Role of TLR4 in ethanol effects on innate and adaptive immune responses in peritoneal macrophages. *Immunol Cell Biol* 89:716-727, 2011.

Pascual M, Pla A, Minarro J, Guerri C. Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol and alcoholism* 49:187-192, 2014.

Pascual M., Blanco A. M., Cauli O., Minarro J., Guerri C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur. J. Metab.* 298, E320–E328, 2007.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, San Diego, 1998.

Pruett SB, Fan R, Cheng B, Glover M, Tan W, Deng X. Innate immunity and inflammation in sepsis: mechanisms of suppressed host resistance in mice treated with ethanol in a binge-drinking model. *Toxicol Sci* 117:314-324, 2010.

Redivo DD, Schreiber AK, Adami ER, Ribeiro DE, Joca SR, Zanoveli JM, Cunha JM. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. *Behav Brain Res* 298:57-64, 2016.

Safieh-Garabedian, B., et al., Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 115(7): p. 1265-75, 1995.

Saper CB, Romanovsky AA, Scammell TE. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome *Nature Neuroscience*, 15(8): 1088–1095, 2012.

Scholz, J. and C.J. Woolf Can we conquer pain? *Nat Neurosci.*, 5 Suppl: p. 1062-7, 2002.

Silveira, DX; Moreira, FG. Panorama atual de drogas e dependências. Atheneu: São Paulo, 2006.

Simone DA, Neural mechanisms of hyperalgesia. *Current opinion in neurobiology.* ;2(4):479–483, 1992.

Spear LP. Adolescent alcohol exposure: are there separable vulnerable periods within adolescence? *Physiol Behav* 148:122–130, 2015.

Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defense. *Alcohol Alcohol* 634:830–841, 1999.

Taiwo YO, Levine JD. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience*. 44(1):131-5, 1991.

Telles TMBB, Oliveira BMT, Lomba LA, Leite-Avalca MG, Correia D, Zamprônio AR. Effects of binge-like ethanol exposure during adolescence on the febrile response in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 41(3):507-515, 2017.

Toga AW, Thompson PM, Sowell ER. Mapping brain maturation. *Trends in Neurosciences*. 29(3):148–159, 2006.

Watkins LR, Hutchinson MR, Milligan ED, Maier SF. “Listening” and “talking” to neurons: implications of immune activation for pain control and increasing the efficacy of opioids. *Brain Res Rev.*;56:148–169, 2007.

Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Smith KP, Martin D, Maier SF. Characterization of cytokine induced hyperalgesia. *Brain Res*; 654:15–26, 1994c.

Watkins, L.R., E.D. Milligan, and S.F. Maier Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci*. 24(8): p. 450-5, 2001.

Watkins, L.R., et al., Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. *Brain Res.*, 692(1-2): p. 244-50, 1995.

Watkins, L.R., Maier, S.F., The pain of being sick: implications of immune-to brain communication for understanding pain. *Annu. Rev. Psychol*. 51, 29–57, 2000.



Watkins, LR, Wiertelak, EP, Goehler, L, Mooney-Keiberger K, Martinez J, Furness L, Smith KP and Maier SF. Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia, *Brain Res.*, 639 283-299, 1994.

Wegner, A., Elsenbruch, S., Maluck, J., Grigoleit, J.S., Engler, H., Jager, M., Spreitzer, I., Schedlowski, M., Benson, S., Inflammation-induced hyperalgesia: effects of timing, dosage, and negative affect on somatic pain sensitivity in human experimental endotoxemia. *Brain Behav. Immun.*, 2014.

Wei F, Qiu CS, Kim SJ, Muglia L, Maas JW, Pineda VV, Xu HM, Chen ZF, Storm DR, Muglia LJ, Zhuo M. Genetic elimination of behavioral sensitization in mice lacking calmodulin-stimulated adenylyl cyclases. *Neuron*.14;36(4):713-26, 2002.

Windle M. Drinking Over the Lifespan: Focus on Early Adolescents and Youth. *Alcohol research current reviews* 38:95-101, 2016.

WHO, World Health Organization Global status report on alcohol and health 2014. *Global Status Report*:1-392, 2014.

Woolf, C.J., et al., Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol*, 121(3): p. 417-24, 1997.

Woolf, C.J., et al., Peripheral cell types contributing to the hyperalgesic action of nerve growth factor in inflammation. *J Neurosci*, 16(8): p. 2716-23, 1996.